



RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT



# **Untersuchung der Lipidnachbarschaft von derivatisiertem GM1 in Modellmembranen und kultivierten Zellen**

**Synthese, Analytik, Kinetik  
Vergleich verschiedener Zelltypen**

---

## **Dissertation**

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

---

vorgelegt von  
Alexander von Coburg  
aus Essen

Bonn 2004



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis Dezember 2003 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:

## ***Dank***

Herrn Professor Dr. Konrad Sandhoff danke ich 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 des SFB 284, die fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der vergangenen Jahre und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

**Abkürzungsverzeichnis**

<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>Ac</i>	Acetyl-
<i>amu</i>	atomic mass unit
<i>av.</i>	average (bei Massenspektrometrie: Durchschnittsmolmasse)
<i>BE</i>	back-exchange
<i>Biotin-C<sub>4</sub>-Säure</i>	4-Biotinamidobuttersäure
<i>Biotin-C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1</i>	Biotin-C <sub>4</sub> -N-stearoyl-lysoGM1
<i>BMP</i>	Bis(monoacylglycero)phosphat
<i>Bq</i>	Bequerel
<i>BSA</i>	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
<i>Bz</i>	Benzoyl-
<i>[<sup>3</sup>H]</i>	Wasserstoffisotop der Masse 3 amu (Tritium)
<i>[<sup>14</sup>C]</i>	Kohlenstoffisotop der Masse 14 amu
<i>C<sub>5</sub>-TPD-GM1</i>	N-5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1
<i>C<sub>6</sub>-TPD-GM1</i>	6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-hexanoyl-lysoGM1
<i>C<sub>10</sub>-TPD-GM1</i>	N-10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekanoyl-lysoGM1
<i>Cer</i>	Ceramid ( <i>N</i> -Acylsphingosin)
<i>Ci</i>	Curie
<i>COP</i>	coat protein
<i>DC</i>	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
<i>DCC</i>	Dicyclohexylcarbodiimid
<i>DMEM</i>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<i>DMF</i>	Dimethylformamid
<i>DOPA</i>	Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidsäure
<i>DOPC</i>	Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholin
<i>DOPE</i>	Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin
<i>DOPS</i>	Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serin
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraaceticacid (Ethylendiamin-tetraessigsäure)
<i>ER</i>	Endoplasmatisches Retikulum
<i>ESI-TOF-MS</i>	Electrospray ionisation-time-of-flight-mass spectrometry
<i>ex.</i>	exact (bei Massenspektrometrie: Monoisotopenmolmasse)
<i>FAB-MS</i>	Fast atom bombardment mass spectrometry

<i>FKS</i>	Fötales Kälberserum
<i>GABA</i>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<i>Gal</i>	Galaktosyl-
<i>GalNAc</i>	<i>N</i> -Acetyl-D-galaktosaminyl-
<i>GD1a</i>	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>Glc</i>	Glucosyl-
<i>GlcCer</i>	Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>Glc-S-Cer</i>	Glucosyl-thio-ceramid
<i>Glc-SO-Cer</i>	Glucosyl-thio-ceramid-Sulfoxid
<i>GM1</i>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>GM2</i>	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>GM3</i>	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>GPI</i>	Glykosyl-phosphatidyl-inositol
<i>GSL</i>	Glykosphingolipide
<i>HEPES</i>	4-(2-Hydroxyethyl)-2-piperazinethansulfonsäure
<i>HMEM</i>	HEPES-buffered minimal essential medium
<i>HMG</i>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
<i>HPLC</i>	High performance liquid chromatography
<i>HPTLC</i>	High performance thin layer chromatography
<i>HRMS</i>	High resolution mass spectrometry
<i>Hünig-Base</i>	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
<i>IDP</i>	Isopentenyl-diphosphat
<i>K<sub>p</sub></i>	Siedepunkt
<i>Lac</i>	Laktosyl-
<i>LacCer</i>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1Cer
<i>l<sub>d</sub>-phase</i>	liquid-disordered phase
<i>l<sub>o</sub>-phase</i>	liquid-ordered phase
<i>MALDI-TOF-MS</i>	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight-mass spectrometry
<i>MEM</i>	Minimal essential medium
<i>MS</i>	Massenspektrometrie
<i>M<sub>w</sub></i>	Molekulargewicht
<i>NANA</i>	<i>N</i> -Acetylneuraminic-acid (Sialinsäure)

<i>NBD</i>	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
<i>NeuAc</i>	<i>N</i> -Acetyl-neuraminyl-, Sialyl-
<i>NMR</i>	Nuclear magnetic resonance, Kernresonanzspektroskopie
<i>NHS</i>	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid
<i>N-O-SM</i>	<i>N</i> -Oleoyl-Sphingomyelin
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
<i>PA</i>	Phosphatidsäure
<i>PC</i>	Phosphatidylcholin
<i>PE</i>	Phosphatidylethanolamin
<i>PG</i>	Phosphatidylglycerol
<i>Ph</i>	Phenyl-
<i>PI</i>	Phosphatidylinositol
<i>PM</i>	Plasmamembran
<i>PS</i>	Phosphatidyl-L-serin
<i>R<sub>f</sub></i>	Dünnschichtchromatographischer Retentionswert
<i>RP</i>	Reversed Phase- (Umkehrphasen-)
<i>rER</i>	raues Endoplasmatisches Reticulum
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
<i>RT</i>	Raumtemperatur (Zimmertemperatur)
<i>SAP</i>	Sphingolipid-Aktivatorprotein
<i>SM</i>	Sphingomyelin ( <i>N</i> -Acyl-D-Sphingosin-1-phosphorylcholin)
<i>Sphingosin</i>	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> )-2-Amino-octadec-4-en-1,3-diol
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>TGN</i>	Trans Golgi Netzwerk
<i>TosOH</i>	p-Toluensulfonsäure
<i>TPD-</i>	Trifluormethylphenyldiazirinylnyl-
<i>v/v</i>	Volumen pro Volumen
<i>w/v</i>	Gewicht pro Volumen

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Endozytose .....	3
2.2	Zellmembranen .....	6
2.3	Domänen („lipid rafts“) in der Plasmamembran.....	11
2.4	Endosomen .....	14
2.5	Lysosomen.....	16
2.6	Biosynthese der Lipide .....	18
2.6.1	Cholesterol .....	18
2.6.2	Diacylglycerophospholipide .....	21
2.6.3	Cardiolipin und BMP .....	23
2.6.4	(Glyko-)Sphingolipide .....	24
2.7	Abbau der (Glyko-)Sphingolipide im Lysosom .....	29
2.8	Lipidspeichererkrankungen .....	32
<b>3</b>	<b>Zielsetzung und Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Synthesen.....	38
3.1.1	Synthese der C <sub>5/10</sub> -TPD-Fettsäure und C <sub>5/10</sub> -TPD-GM1- Photosonde .....	38
3.1.2	Synthese der biotinylierten GM1-Derivate .....	47
3.1.3	Synthese der NBD-GM1-Derivate .....	50
3.2	NBD-Insertionsexperimente.....	53
3.3	Zellversuche mit biotinylierten GM1-Derivaten.....	55
3.4	Photoaktive GM1-Derivate (TPD-GM1) .....	60
3.4.1	Charakteristika der TPD-Derivate.....	61
3.4.2	Liposomenexperimente mit photoaktiven GM1-Derivaten.....	63
3.4.2.1	Untersuchungen zu Photokopplungsprodukten von C <sub>5</sub> -TPD-GM1 (N-5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1) in Modellmembranen .....	64
3.4.2.2	Erstellung einer Referenzbibliothek der Kopplungsprodukte von C <sub>10</sub> -TPD-GM1 (N-10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)-	



dekanoyl-lysoGM1) und verschiedenen Lipiden in Modellmembranen .....	66
3.4.2.3 Untersuchungen zur Photoinsertion in Wasser .....	74
3.4.2.4 Bestimmung der $R_f$ -Werte der gefundenen Photokopplungsprodukte in Modellmembranen.....	76
3.4.2.5 Massenspektrometrische Untersuchung der gefundenen Banden durch MALDI-TOF-MS.....	77
3.5 Zellversuche mit photoaktiven GM1-Derivaten .....	80
3.5.1 Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen $C_5$ -TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten .....	81
3.5.1.1 Untersuchung der Lipidumgebung von $C_5$ -TPD-GM1 in der Plasmamembran humaner Fibroblasten.....	84
3.5.1.2 Ändert sich die Lipidumgebung von $C_5$ -TPD-GM1 im Zuge der Endozytose?.....	89
3.5.2 Untersuchungen zur Photokopplung der $C_{10}$ -TPD-GM1-Sonde mit Lipiden in inneren Membranen verschiedener Zelltypen .....	95
3.5.1.2 Kopplungsprodukte von $C_{10}$ -TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten normaler Probanden.....	98
3.5.2.2 Kopplungsprodukte von $C_{10}$ -TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick-Typ C- Erkrankung .....	100
3.5.2.3 Kopplungsprodukte von $C_{10}$ -TPD-GM1 in humanen Fibroblasten von Patienten mit Morbus-Landing-Erkrankung .....	103
3.5.2.4 Kopplungsprodukte von $C_{10}$ -TPD-GM1 in Membranen von „Chinese Hamster Ovary Cells“ .....	106
3.5.2.5 Graphische Darstellung und Zusammenfassung der Insertionsexperimente mit $C_{10}$ -TPD-GM1 in den verschiedenen Zelltypen .....	108
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>111</b>
4.1 Synthesen.....	112
4.1.1 Synthese der NBD-Derivate.....	112
4.1.2 Synthese der Biotin-Derivate .....	112
4.1.3 Synthese der TPD-Derivate .....	113

4.2	Zellinsertionsexperimente mit derivatisierten Gangliosiden .....	114
4.3	Lipidumgebung der TPD-Photosonden in Modellmembranen .....	115
4.4	Lipidumgebung der TPD-Photosonden in kultivierten Zellen .....	117
4.4.1	Insertion von C <sub>5</sub> -TPD-GM1 in die Plasmamembran.....	118
4.4.2	Kopplungsprodukte von C <sub>5</sub> -TPD-GM1 in inneren Membranen.....	119
4.4.3	Kopplungsprodukte von C <sub>10</sub> -TPD-GM1 in späten abbauenden Organellen.....	120
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>123</b>
5.1	Material .....	123
5.1.1	Geräte .....	123
5.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	124
5.1.3	Biologische Materialien .....	125
5.1.3.1	Verwendete Zellkulturen.....	125
5.1.3.2	Zellkulturmedien und Puffer.....	125
5.2	Methoden .....	127
5.2.1	Analytische Methoden.....	127
5.2.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	127
5.2.1.2	Quantifizierung der Radioaktivität .....	128
5.2.1.3	NMR-Spektroskopie (Nuclear magnetic resonance).....	128
5.2.1.4	Massenspektrometrie (MS) .....	129
5.2.1.5	Proteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	130
5.2.2	Präparative Methoden .....	130
5.2.2.1	Darstellung der Liposomen .....	130
5.2.2.2	Belichtung der Liposomen .....	131
5.2.2.3	Extraktion der Photokopplungsprodukte aus Kieselgel-Platten für die Massenspektrometrie .....	131
5.2.2.4	Gerfierschnitt-Technik und Immunmarkierung .....	131
5.2.3	Einbau- und Stoffwechselstudien.....	132
5.2.3.1	Herstellung der Sphingolipid-Albumin-Komplexe .....	132
5.2.3.2	Inkubation der Zellen mit Lipid/BSA-Komplexen .....	132
5.2.3.3	Inkubation langkettiger Ganglioside aus Mizellen.....	133
5.2.3.4	Re-extraktion photoaktivierbarer Lipide aus der Plasmamembran („back-exchange“). .....	133

5.2.3.5	Belichtung der Zellen.....	133
5.2.3.6	Zellemte .....	133
5.2.3.7	Lipidextraktion .....	134
5.2.3.8	Trypsinierung von Zellen.....	134
5.2.3.9	Entsalzen von Reaktionsansätzen und Abtrennung von wasserlöslichen Komponenten .....	134
5.2.3.10	Alkalische Methanolyse.....	135
5.3	Synthese .....	136
5.3.1	Synthese der photoaktivierbaren C <sub>5/10</sub> -Fettsäure(n) .....	136
5.3.2	Synthese der radioaktiven Biotinlabel .....	145
5.3.3	Synthese der Gangliosidderivaten .....	147
5.3.4	Synthese der photoaktivierbaren Gangliosidderivaten.....	151
5.3.5	Synthese der Biotin-markierten Gangliosidderivaten .....	156
5.3.6	Synthese der NBD-markierten Gangliosidderivaten .....	158
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>161</b>

## **1 Zusammenfassung**

In eukaryontischen Zellen und ihren Organellen sind die begrenzenden Membranen aus einer Vielzahl von verschiedenen Lipid- und Proteinmolekülen zusammengesetzt. Der Aufbau solcher Membranen erfolgt jedoch nicht nur nach rein statistischen Verteilungen, sondern es kann innerhalb der Membranhälften der Lipiddoppelschicht zu einer bestimmten Anordnung bzw. einer Domänenbildung von Lipiden und Proteinen kommen. Prominente Vertreter wie zum Beispiel Phosphatidylcholin finden sich überwiegend auf der äußeren Seite der Membranen, sowie auch Sphingomyelin oder Glykosphingolipide. Außerdem findet man Regionen, in denen bestimmte Lipide gehäuft auftreten. Die Untersuchung der genauen lateralen Verteilung einzelner Lipide in der Membran und der Sortierprozesse, die während des Transportes innerhalb der Zelle und der Bildung solcher Membrandomänen stattfinden, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In der vorliegende Arbeit wurde am Beispiel des Gangliosids GM1 untersucht, wie sich die Lipidumgebung von Glykosphingolipiden im Zuge ihrer Endozytose in kultivierten Zellen verändert. Dazu wurden radioaktiv markierte Derivate von GM1 synthetisiert, welche an Hand chemischer Markierungen in der Zelle beobachtet werden konnten. So wurden Derivate hergestellt, die in ihrer Acylkette ein Fluorophor (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-amino-Gruppe (NBD-Gruppe)) tragen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden können.

Eine andere Derivatisierung der Acylkette erfolgte durch Einführung einer photolabilen Trifluormethylphenyldiaziriny-Gruppe (TPD-Gruppe), die nach Belichtung mit UV-Licht kovalent an eines ihrer direkt benachbarten Moleküle binden. Auf Grund unterschiedlicher Verhalten innerhalb der Zelle wurden zwei Derivate verschiedener Kettenlänge synthetisiert.

Außerdem wurde in Fortführung der Diplomarbeit ein an der Sialinsäure derivatisiertes Biotin-GM1 hergestellt und durch Anti-Biotin-Antikörper elektronenmikroskopisch in der Zelle lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Derivate in bestimmten Bereichen der Plasmamembran akkumulieren.

Für die Experimente mit TPD-Derivaten wurden zunächst in Liposomen Kopplungsprodukte hergestellt, die mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert werden konnten. Für die nachfolgenden Zellversuche dienten diese als Referenzen.

Die kurzkettigen Gangliosidderivate konnten an Albumin gebunden und aus den resultierenden Komplexen in die Plasmamembran von Fibroblasten inkorporiert werden. Da bei dieser Verfahrensweise mit Temperaturen gearbeitet werden kann, bei denen keine Endozytose erfolgt, konnten hier die Photosonden erst in die Plasmamembran inseriert werden, bevor nach Aufhebung des Temperaturblocks die Kinetik der Endozytose untersucht werden konnte. Dabei zeigte sich, dass diese kurzkettigen Derivate nach Insertion in die Plasmamembran von kultivierten Fibroblasten in sehr cholesterolreiche Umgebungen segregieren, die als Mikrodomänen bzw. „rafts“ bezeichnet werden. Weitere Kopplungsprodukte mit anderen Hauptbestandteilen der extrazellulär orientierten Membranhälfte wie Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (SM) konnten hierbei nur in geringem Maße nachgewiesen werden. In Modellmembranen hingegen konnte keine besondere Affinität bezüglich eines Kopplungspartners festgestellt werden. Auch zeigte sich, dass im Zuge der Endozytose, die Sonden sich auf intrazellulären Vesikeln und inneren Membranen in einer gänzlich anderen Lipidnachbarschaft befinden. Es konnten keine Präferenzen zu Cholesterol mehr festgestellt werden, stattdessen traten vermehrt Kopplungen mit Phosphoglycerolipiden wie PC oder auch Sphingomyelin auf.

Die langkettigen Derivate konnten ebenfalls in Modellmembranen inseriert und ihre Kopplungsprodukte charakterisiert werden. Allerdings war es hierbei nicht möglich bei Temperaturen zu arbeiten, die die Endozytose blockieren, da Ganglioside mit langer Acylkette (größer  $C_{12}$ ) nicht aus einem BSA-Lipid-Komplex in Zellmembranen zu inserieren sind. Jedoch reichern sie sich in abbauenden Organellen, wie späte Endosomen oder Lysosomen, an. So konnte hier in verschiedenen Zelltypen (mit und ohne pathologische Defekte) ein BMP-Kopplungsprodukt gefunden werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass BMP sich auf intraendosomaler/-lysosomaler Vesikel befindet und hier den Abbau von Membranbestandteilen stimuliert. Bei beiden TPD-Derivaten fällt der hohe Anteil an Kopplungsprodukt von Photosonde und Wasser auf. Dieser ist auf den Wassergehalt in Membranen und auf Kopplungen mit Wasser außerhalb der Membranen zurückzuführen, welche durch die „off-rate“ der verwendeten Sonden bedingt ist. Dass die „off-rate“ eine große Rolle spielt, wird dadurch deutlich, dass das kurzkettige  $C_5$ -TPD-Derivat (mit hoher „off-rate“) zu einem weitaus höheren Anteil in Wasser inseriert, als die entsprechende langkettige Verbindung ( $C_{10}$ -TPD-GM1).

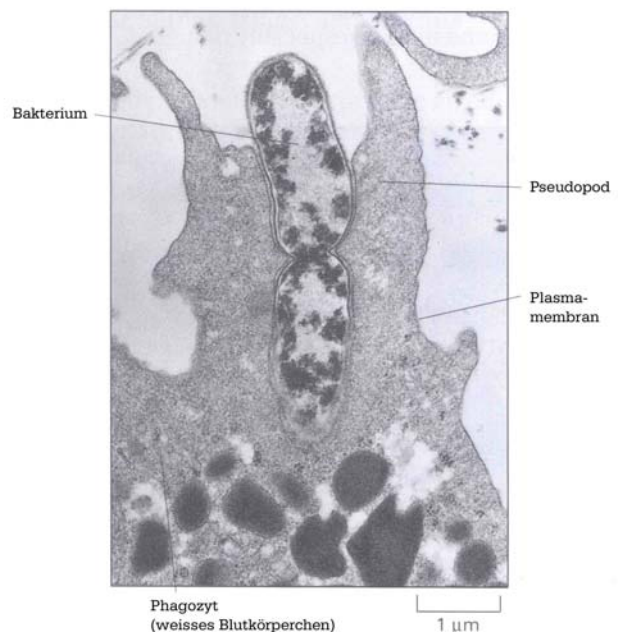
## 2 Einleitung

### 2.1 Endozytose

Der Prozess der Endozytose trägt dazu bei, durch einen gesteuerten Membranfluss das Gleichgewicht der Funktionen einer Zelle respektive eines Organismus aufrechtzuerhalten. Durch zelluläre Interaktionen mit ihrer Umgebung werden Nährstoffe aufgenommen oder auch Signalsubstanzen und Wachstumsfaktoren weitergeleitet bzw. internalisiert.

Im Zuge der Endozytose werden innerhalb kürzester Zeit große Mengen an Plasmamembran in die Zelle aufgenommen. So wird in humanen Fibroblasten innerhalb von zwei Stunden Material ausgetauscht, welches der gesamten Zelloberfläche entspricht. In Mausmakrophagen werden pro Stunde 25% des Zellvolumens extrazelluläres Medium inkorporiert.<sup>i</sup> Die Mechanismen, die das Abknospen von Vesikeln, die Steuerung, den Transport und die Fusion katalysieren, unterliegen einer Vielzahl von physiologischen Prozessen (wie kontrolliertem Ausstoß von Neurotransmittern oder Hormonen), gesteuert durch eine komplexe Protein-Maschinerie.<sup>ii</sup>

Im Groben unterscheidet man zwischen Phagozytose und Pinozytose als Typen der Endozytose. Bei der Phagozytose werden große Partikel, wie z.B. Mikroorganismen, Organellen oder auch andere Zellen aufgenommen. Phagozytose wird von spezialisierten Zellen, den Phagozyten, durchgeführt. Bei Säugetieren gibt es z.B. die weißen Blutkörperchen: Makrophagen, Neutrophile (i.e. neutrophile Granulozyten) und dendritische Zellen, welche alle von hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden und der



**Abbildung 2-1:** Phagozytose eines sich teilenden Bakteriums durch einen Neutrophilen<sup>iii</sup>

<sup>i</sup> Steinman R.M. et al. (1983), J. Cell Biol.

<sup>ii</sup> Rothman, J.E., Wieland, F.T. (1996), Science

<sup>iii</sup> Alberts, B. et al. (2002), Garland Science

Immunabwehr dienen. Der erste Schritt der Phagozytose ist eine Bindung des aufzunehmenden Materials an die Zelloberfläche. Phagozyten besitzen eine Vielzahl spezialisierter Oberflächenrezeptoren, welche erkennen, ob das zu bindende Material aufgenommen werden soll oder nicht. So binden Antikörper der Immunabwehr an infektiöse Mikroorganismen und bilden einen dichten Mantel. Ihr Schwanz, die sogenannte Fc-Region, ragt dabei nach außen. Diese Region wird nun wiederum durch Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen erkannt. Durch die Aktivierung der Rezeptoren werden Transmittersignale an das Zellinnere weitergegeben, welche die Zelle veranlassen Pseudopoden auszubilden, die das Partikel umschließen.

Die zweite Form der Endozytose ist die Pinozytose, in der Teile der Plasmamembran in Form von Vesikeln in das Zellinnere aufgenommen werden. Einerseits gibt es eine rezeptorvermittelte Endozytose über Stachelsaumgrübchen (clathrin coated pits), bei der sich Clathrinmoleküle auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran befinden. Diese spezialisierten Regionen nehmen ca. 2% der gesamten Plasmamembran ein. Bei der Abschnürung als Stachelsaumvesikel („clathrin coated vesicles“) wird dann die Clathrinhülle durch eine ATPase entfernt.<sup>1</sup> Der Zeitraum vom Übergang des „coated pit“ zum „coated vesicle“ liegt im Minutenbereich, und man geht davon aus, dass jede Minute ca. 2500 Vesikel die Plasmamembran eines Fibroblasten verlassen. Nach Bildung der Vesikel und Entfernung des Proteinmantels verschmelzen sie mit frühen Endosomen und geben dort ihren Inhalt ab. Die Aufnahme spezifischer Makromoleküle erfolgt über eine Rezeptor vermittelte Endozytose, bei der diese Moleküle an Transmembran-Rezeptor-Proteine binden. (siehe LDL vermittelte Endozytose des Cholesterols – Kap. 2.6.1).

---

<sup>1</sup> Goldstein, J. L. et al. (1985), Ann. Rev. Cell Biol.

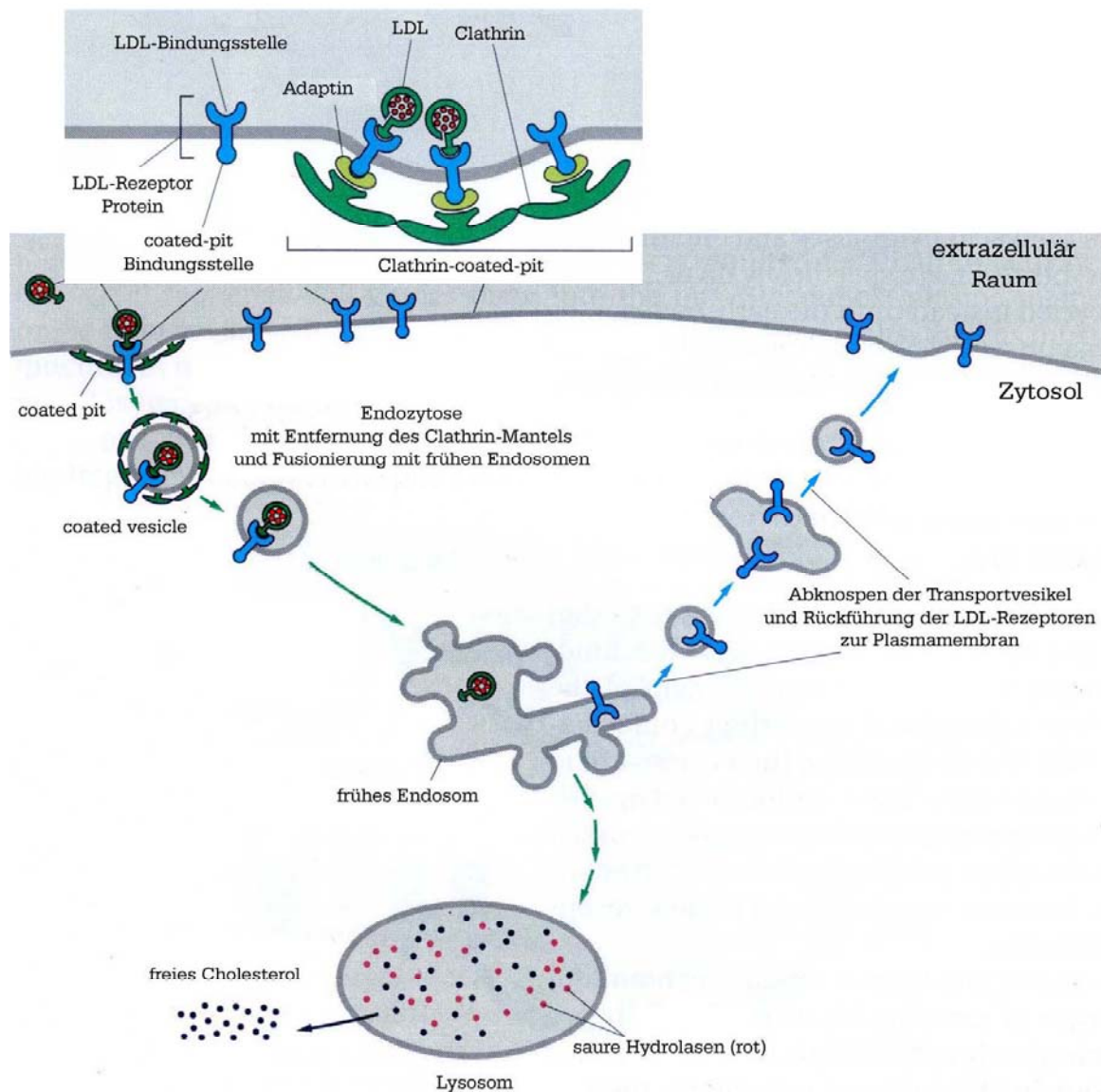


Abbildung 2-2: LDL-vermittelte Endozytose<sup>i</sup>

Daneben findet man noch eine Clathrin unabhängige Endozytose, wie z.B. die Abschnürung über Caveolae.<sup>ii</sup> Caveolae findet man in den Plasmamembranen der meisten Zelltypen. Die bereits in den 50er Jahren morphologisch nachgewiesenen Caveolae<sup>iii</sup> können leicht unter dem Elektronenmikroskop als Einstülpungen erkannt werden.<sup>iv</sup> Man geht davon aus, dass sie aus Mikrodomänen („lipid rafts“) mit spezifischer Lipid- und Proteinzusammensetzung aus der Plasmamembran gebildet

<sup>i</sup> modifiziert aus : Alberts, B. et al. (2002), Garland Science

<sup>ii</sup> Parton, R. G. et al. (1994), J. Cell. Biol.

<sup>iii</sup> Palade, G.E. (1953), J. Appl. Phys. / Yamada, E. (1955), J. Biophys. Biochem. Cytol.

<sup>iv</sup> Anderson, R.G.W. (1998), Annu. Rev. Biochem.



werden.<sup>i</sup> Diese Domänen sind reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden und GPI-verankerten Membranproteinen, deren prominentester Vertreter Caveolin ist (siehe Kap. 2.3.). Im Gegensatz zu Clathrin vermittelter Endozytose und COPI- oder COPII-Vesikeln geht man bei dieser Art der Endozytose davon aus, dass die Lipidzusammensetzung der caveolaren Membran ausschlaggebender Faktor für die Invagination und den Transport ist. Der Weg der Caveolae kann einerseits zu Endosomen oder andererseits über einen polaren Fluss zu der gegenüberliegenden Plasmamembran (Transzytose) führen. Die Regulation der Sortierprozesse, die Vesikel zu ihren vielfältigen Bestimmungsorten führen, sind Gegenstand weiterer Studien.

Neben diesen ATP-abhängigen endozytotischen Prozessen konnte auch eine ATP-unabhängige Form der Abschnürung von Vesikeln gefunden werden. Durch Einwirkung von Sphingomyelinase wurde bei Vertebratenzellen eine Bildung von Vesikeln ohne Clathrin oder Caveolin erreicht. Der weiterführende Transport zu endosomalen Kompartimenten oder Lysosomen erfolgt dann allerdings wieder ATP-abhängig.<sup>ii</sup>

## 2.2 Zellmembranen

Membranen von Zellen dienen der Kompartimentierung von Reaktionsräumen und damit der Regulation biologischer Prozesse. Als äußere Hülle dient die Plasmamembran. Bei eukaryontischen Zellen findet man zusätzlich viele subzelluläre Organellen (Kern, Mitochondrien, Golgi, etc.), die durch Membranen begrenzt werden.

Biologische Membranen sind Aggregate von Lipiden (Glykolipiden), Proteinen und Glykoproteinen. Die folgende Tabelle 2-1 zeigt die Zusammensetzung verschiedener Membranen und das Verhältnis von Proteinen und Lipiden.

---

<sup>i</sup> Fra, A. M. et al. (1995), FEBS Lett.

<sup>ii</sup> Zha, X. et al. (1998), J. Cell Biol.

Membran	Protein (%)	Lipid (%)	Kohlenhydrate (%)	Protein-Lipid-Verhältnis
<b>Plasmamembran</b>				
Maus-Leberzellen	46	54	2-4	0,9
menschlicher Erythrozyt	49	43	8	1,1
Amöben	52	42	4	1,3
<b>Organellmembran (Ratte)</b>				
Kernmembran	59	35	2	1,6
äussere Mitochondrienmembran	52	48	2-4	1,1
Innere Mitochondrienmembran	76	24	1-2	3,2
Myelin	18	79	10	0,2
Gram-positive Bakterien	75	25	-	3,0

Tabelle 2-1: Zusammensetzung einiger biologischer Membranen (Werte in Gew. %) <sup>i</sup>

Durch in die Membran eingebettete Pumpen und Kanäle wird die Zusammensetzung des intrazellulären Milieus kontrolliert und durch spezifischen Transport von Ionen, Nährstoffen oder auch Abfallprodukten reguliert. Der Aufbau solcher Membranen erfolgt nach einem einheitlichen Muster in Form einer zusammenhängenden Doppelschicht von ca. 5 nm Dicke aus amphiphatischen Lipiden. Diese werden durch nicht-kovalente Bindungen in wässrigen Medien vor allem durch die hydrophobe Wechselwirkungen und schwache Van der Waals-Kräfte zusammengehalten.

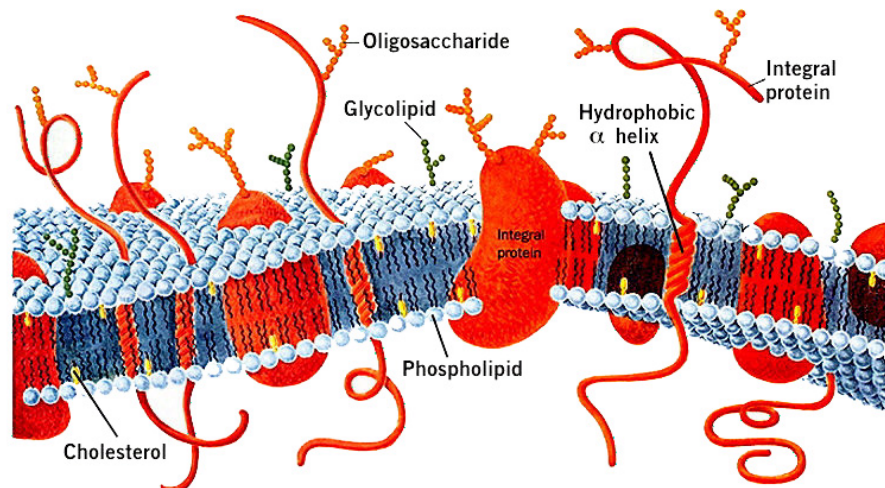


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung einer Plasmamembran <sup>ii</sup>

<sup>i</sup> Guidotti, G. (1972), Annu. Rev. Biochem.

<sup>ii</sup> Voet, D., Voet J.G. (1990), Wiley

Die Membran stellt eine mehr oder weniger undurchlässige Barriere für die meisten wasserlöslichen Moleküle dar. Eine typische Zellmembran von Säugetieren ist aus 100 bis 200 verschiedenen Lipiden zusammengesetzt, wobei Phospholipide den Hauptbestandteil darstellen. Lipide bilden ungefähr 50% der Gesamtmasse von Zellmembranen, und auf  $1 \mu\text{m}^2$  finden sich ca.  $5 \times 10^6$  Lipidmoleküle (ca.  $10^9$ - $10^{11}$  pro Zelle). Das Lipidmuster variiert je nach Membran, wie folgende Tabelle zeigt.

Lipid	humane Erythrocyten	humanes Myelin	bovines Myelin	Rinderherz Mitochondrien	Escherichia coli
Phosphatidsäure	1,5	0,5	-	-	-
Phosphatidylcholin	19	10	7,5	39	-
Phosphatidylethanolamin	18	20	12	27	65
Phosphatidylglycerin	-	-	-	-	18
Phosphatidylinositol	1	1	1	7	-
Phosphatidylserin	8,5	8,5	7	0,5	-
Cardiolipin	-	-	-	22,5	12
Sphingomyelin	17,5	8,5	6,5	-	-
Cholesterin	25	26	17	3	-
Glykolipide	10	26	22	-	-

Tabelle 2-2: Lipidzusammensetzung einiger biologischer Membranen (Werte in Gew. % vom Gesamtlipid)<sup>i</sup>

<sup>i</sup> Tanford, C. (1978), Science / Dewey, M.M. und Barr, L. (1970), Curr. Top. Membr. Transp.

Allen Lipiden gemeinsam ist ihr amphiphatischer Charakter durch eine polare hydrophile Kopfgruppe und einen unpolaren hydrophoben Rest. Bei Phospholipiden besteht dieser aus zwei Fettsäureketten unterschiedlicher Länge, meistens zwischen 14 und 24 C-Atomen. Auch beinhaltet eine dieser Ketten oft eine (oder mehrere) *cis*-Doppelbindung, so dass durch diesen kleinen Knick die Gleichförmigkeit der Packung gestört wird.

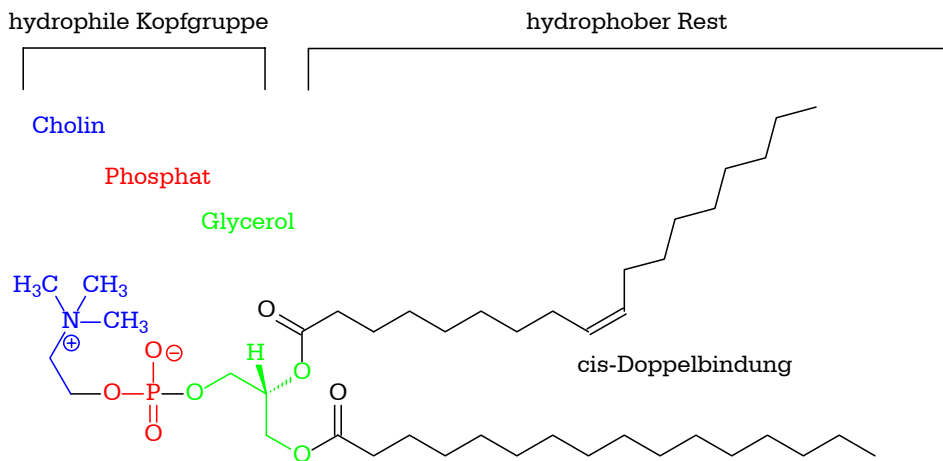


Abbildung 2-4: Beispiel eines Phospholipids – hier R-Phosphatidylcholin

Die Bestandteile sind gegeneinander verschiebbar, was der Membran einen flüssigen Charakter verleiht.<sup>1</sup> Die Fluidität hängt in erster Linie neben der Lipidzusammensetzung von der Temperatur ab. Bei bestimmten Temperaturen (Übergangstemperaturen) gehen Membranen von einem semikristallinen in einen flüssigeren Zustand über. Je höher der Anteil an ungesättigten Lipiden, d.h. solche, die *Z*-Doppelbindungen in den Alkylketten ihrer Acylreste besitzen, desto niedriger ist die Übergangstemperatur. Natürliche Membranen werden vom jeweiligen Organismus üblicherweise bei einer gleichbleibenden Umgebungstemperatur gehalten, um deren 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 (siehe Kapitel 2.3)

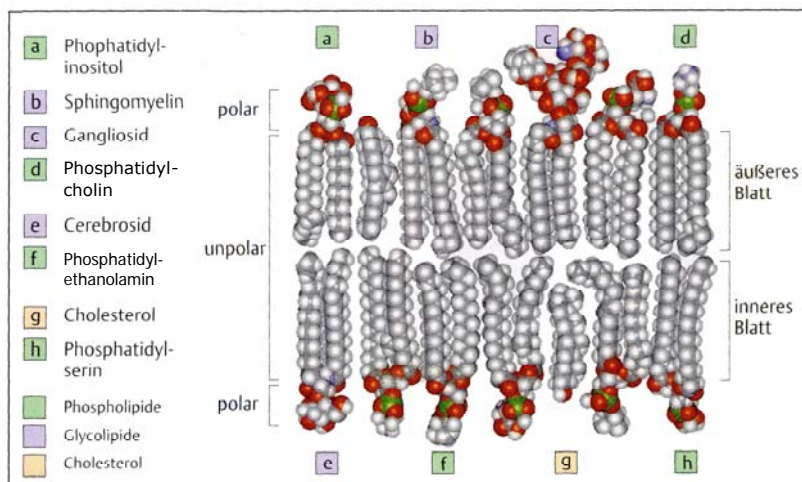
<sup>1</sup> Singer, S.J. und Nicholson, G.L. (1972), Science

Des Weiteren beeinflusst der Cholesterolgehalt die Fluidität von Membranen. Während er in semikristallinen, eng gepackten Membranen die Fluidität erhöht, verfestigt er flüssige Membranen. Mit seiner starren Steroidgruppe bindet Cholesterol an die Fettsäureregionen in der Nähe der polaren Kopfgruppe und führt damit zu einer Stabilisierung dieser Regionen.<sup>i</sup> Durch die Einschränkung der Beweglichkeit der primären CH<sub>2</sub>-Gruppen der Acylketten macht es die Membran an dieser Stelle weniger deformierbar und verringert die Durchlässigkeit gegenüber kleinen, wasserlöslichen Molekülen. Des Weiteren verhindert es als „Abstandshalter“ ein Zusammenkleben der Kohlenstoffketten und somit ein Auskristallisieren bzw. Phasenübergänge.

Neben dieser lateralen Bewegung gibt es auch die transversale Bewegung („flip-flop“), welche nur von sehr wenigen Lipidklassen (z.B. Cholesterol) 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.<sup>ii</sup> Für den Seitenwechsel benötigen Phospholipide besondere Hilfsproteine (Translokatoren, „Flipasen“).

Auch der Aufbau der beiden Membranhälften ist unterschiedlich. Während Cholesterol in beiden Membranhälften einer Lipiddoppelschicht zu finden ist, 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



**Abbildung 2-5:** Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Membranhälfte<sup>iii</sup>

<sup>i</sup> Xu, X. und London, E. (2000), Biochemistry

<sup>ii</sup> Kornberg, R.D. und McConnell H.M. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci

<sup>iii</sup> Koolman, J. und Röhm, K.H. (2003) Thieme

orientiert.<sup>i</sup> Glykolipide finden sich vor allem auf der äußeren Seite der Plasmamembran. Dort bilden sie mit den Glykoproteinen die äussere Zellhülle (Glykokalix).

Die Asymmetrie der Membranhälften wird bereits an dem Syntheseort der Bestandteile erzeugt. Phospholipide, wie zum Beispiel PE oder PS werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch einen Protein-vermittelten Transport mittels der ATP-abhängigen Aminophospholipid-Translokase auf die andere Membranseite befördert.<sup>ii</sup> Die asymmetrische Verteilung der Glykosphingolipide und des Sphingomyelins in Membranen ist durch die Topologie der Synthese zu erklären, die, mit Ausnahme des Glucosylceramids, auf der luminalen Seite der Golgi-Membranen stattfindet.<sup>iii</sup>

Wie erwähnt, sind Glykolipide nicht in der Lage, durch spontane transversale Diffusion in die jeweils andere Lipidschicht von Membranen zu gelangen. Dadurch wird diese asymmetrische Ausrichtung auch bei einem vesikulären Transport von der Plasmamembran zu anderen Organellen oder *vice versa* (zur Plasmamembran) beibehalten.

### 2.3 Domänen („lipid rafts“) in der Plasmamembran

Als „lipid rafts“ bzw. Mikrodomänen werden dynamische Assoziate von Cholesterol und Sphingolipiden bezeichnet, die sich in der exoplasmatischen Seite von zellulären Membranen bilden<sup>iv</sup> Allerdings muss beachtet werden, dass in jüngster Zeit dieses Bild der Domänenbildung nicht völlig zweifelsfrei betrachtet wurde. So sollte die Existenz der „lipid rafts“ nicht als bewiesen angesehen werden, sondern eher als ein unbewiesenes, wenn auch nützliches Modell.<sup>v</sup>

Hauptsächlich auf der Plasmamembran von Zellen lokalisiert, wurden diese Domänen jedoch in letzter Zeit auch auf inneren Membranen, wie der Golgi-Membran postuliert und dienen hier wohl der Partitionierung der Membranbereiche.<sup>vi</sup> Je nach angewandter Untersuchungsmethode findet man Angaben über die Größe von Mikrodomänen von ca. 30 bis 500 nm. Protein-Protein- oder Protein-Lipid-

---

<sup>i</sup> Bretscher, M.S. (1973), Science

<sup>ii</sup> Devaux, P.F. und Zachowski, A. (1994), Chem. Phys. Lipids

<sup>iii</sup> Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1990), Biochemistry

<sup>iv</sup> Simons, K. und Ikonen, E. (1997), Nature

<sup>v</sup> Munro, S. (2003), Cell

<sup>vi</sup> Gkantiragas, I. et al. (2001), Mol. Biol. Cell

Wechselwirkungen führen in diesen Domänen zu selektivem Ein- oder Ausschluss von Proteinen. Im trans Golgi Netzwerk fügen sich Membranproteine in „rafts“ ein, die über längere Transmembrandomänen verfügen, da die Doppelschicht in diesen Domänen ein wenig dicker ist als in der restlichen Membran.<sup>i</sup> Cholesterol verdichtet durch Bildung fester Assoziate mit Sphingolipiden, welche gesättigte Acylketten tragen, die Membranen. Hierbei entstehen Membranbereiche mit anderen Eigenschaften als den oben erwähnten flüssig-kristallinen (bzw. „liquid-disordered,  $L_d$ “) bzw. den Gel-Phasen. Diese sogenannte „liquid-ordered ( $L_o$ ) phase“ wird als Zustand für Mikrodomänen beschrieben, in dem die Acylketten der Lipide ähnlich wie in der Gel-Phase gestreckt und dichter gepackt sind, aber dennoch eine hohe laterale Mobilität besitzen.<sup>ii</sup> In neueren Berichten zeigte sich, dass neben Cholesterol auch verschiedene natürliche Sterole Domänen-bildende Eigenschaften besitzen. In Modellmembranen förderten sowohl Pflanzen-, als auch Pilzsterole die Bildung dicht gepackter Lipiddomänen.<sup>iii</sup> Dabei zeigten Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol sogar deutlich höhere Tendenzen zur Domänenbildung als Cholesterol selber. Ob dies an der zweiten ungesättigten Bindung im B-Ring des Steroidgerüsts liegt, wird derzeit noch diskutiert. Als gesichert gilt jedoch der, wenn auch schwächere Einfluss der aliphatischen Seitenkette. Auch in niederen Eukaryonten wie Hefen ist die Existenz von Sterol-Sphingolipid-reichen Domänen bekannt, in denen Ergosterol statt Cholesterol in die „rafts“ eingebaut wird.<sup>iv</sup>

Neben Cholesterol spielt auch die Struktur des beteiligten Sphingolipids eine signifikante Rolle. So findet man mit Sphingomyelin (SM) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) eine stärkere Tendenz zur Domänenbildung als im Vergleich mit Cerebrosiden. Möglicherweise liegt dies an der Fähigkeit SM-reicher Domänen, einen höheren Anteil an Sterolen zu inserieren.<sup>v</sup> Bemerkenswerterweise stabilisiert ein geringer Anteil an Ceramid (ca. 3 mol %) die Domänenbildung in Sphingolipid/Sterol/Phospholipid-Modellmembranen. Da Ceramid bereits in reinen Gemischen mit Phospholipiden zu Phasentrennung führt, stabilisiert es den Zustand der „liquid-ordered“ Gel-Phase.<sup>vi</sup> Die Verbindung mit

---

<sup>i</sup> Bretscher, M.S. und Munro, S. (1993), Science

<sup>ii</sup> Brown, D.A. und London, E. (1998), Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.

<sup>iii</sup> Xu X. et al. (2001), J. Biol. Chem.

<sup>iv</sup> Bagnat, M. et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<sup>v</sup> Xu, X. und London, E. (2000), Biochemistry

<sup>vi</sup> Carrer D.C. et al. (2003), Chem. Phys. Lipids.

GM1 führte zu einer Kondensation durch intermolekulare Wechselwirkung und damit zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur und Größe der Liposomen. In Gemischen mit verschiedenen Phosphatidylcholinen segregierte Ceramid seitwärts in der „liquid-ordered“ Gel-Phase, so dass sich Domänen bilden, deren Schichtdicke von der Konzentration und Kettenasymmetrie des Sphingolipids abhängig ist. Dieser Effekt konnte in verstärkter Form nun auch für SM/Cholesterol/DPPC-Gemische bestätigt werden, und die Vermutung liegt nahe, dass in biologischen Membranen Ceramid unter bestimmten Bedingungen *in vivo* Cholesterol substituiert und zu einer Verstärkung der Domänenbildung führt.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Beispielen für die Funktionen von Mikrodomänen postuliert. So wurden Mechanismen beschrieben, an denen die „rafts“ als Plattformen beteiligt sein könnten, z.B. beim „Sorting“ von Lipiden und Proteinen<sup>i</sup> oder auch in der Signaltransduktion<sup>ii</sup>. Dabei wurde besonders häufig die Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen in den Mikrodomänen erwähnt. Ebenso werden vermehrt Glykosphingolipide (GSL) in diesen exoplasmatischen Membranbereichen gefunden, wohingegen auf der zytosolisch orientierten Seite z.B. Tyrosin-Kinasen der *src*-Familie und auch die  $\alpha$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen lokalisiert sind. Die Lipidzusammensetzung dieser zytosolisch-orientierten Membranhälfte der Mikrodomänen ist bislang nur unzureichend charakterisiert worden. Erste Hinweise haben ergeben, dass eine Anreicherung von Phosphoglycerolipiden mit gesättigten Fettsäureresten und Cholesterol vorliegt.<sup>iii</sup> Auch in der Internalisierung von Bakterien und Viren wurden Domänenbeteiligungen postuliert.<sup>iv</sup> Hierbei dienen Caveolae oder Mikrodomänen als Eingangportal zur Zelle für pathogene Organismen, die vor dem später beschriebenen lysosomalen Abbau auf verschiedene Weisen geschützt sind oder den endozytotischen Weg vermeiden. Anders als die ebenen Membranbereiche der „rafts“ sind Caveolae als 50-100 nm große Einstülpungen (Invaginationen) der Membranen im Elektronenmikroskop sichtbar.<sup>v</sup>

Im Gegensatz zu den „rafts“, bei denen keine Beteiligung von Strukturproteinen gefunden wurde, konnten bei den Caveolae die Proteine Caveolin-1, -2 und -3 als

---

<sup>i</sup> Ikonen, E. (2001), *Curr. Opin. Cell Biol.*

<sup>ii</sup> Simons, K. und Toomre, D. (2000), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

<sup>iii</sup> Fridriksson, E.K. et al. (1999), *Biochemistry*

<sup>iv</sup> Duncan M.J. et al. (2002), *Cell Microbiol.*

<sup>v</sup> Rothberg, K.G. et al. (1990), *J. Cell Biol.*



strukturbildende Elemente identifiziert werden. Diese Caveoline sind Cholesterol-bindende Proteine. Sie werden als homo- und heterooligomere Komplexe in vielen Zelltypen, z.B. Fibroblasten, Adipozyten, Endothel- oder Epithelzellen exprimiert. In Muskelzellen findet man vor allem Caveolin-3. Dabei bilden die Caveolin-Oligomere Haarnadelstrukturen aus, die zur Krümmung der Membranen führen (siehe Abb. 2-2 – Kap. 2.1). Ebenso wie in den „rafts“ wurde in den Caveolae ein erhöhter Gehalt an Glykosphingolipiden gefunden. In unserer Abteilung konnte anhand von Immunogold-Markierungen im Elektronenmikroskop gezeigt werden, dass ein inkorporiertes biotinyliertes Gangliosid GM1 in Form von Clustern in der Plasmamembran und innerhalb der Caveolae vorliegt.<sup>i</sup> Weiterhin konnte durch Photoaffinitätsmarkierung in einer weiteren Arbeitsgruppe die direkte Nachbarschaft vom GM1 zum Caveolin-1 (VIP-21) erkannt werden.<sup>ii</sup>

## 2.4 Endosomen

Als erste Strukturen des endozytotischen Weges gelten die frühen Endosomen. Auf Grund der morphologischen Heterogenität und ihrem „unauffälligen“ Erscheinungsbild sind diese Kompartimente nicht in der Weise eindeutig identifizierbar wie vergleichbare Strukturen des biosynthetischen oder sekretorischen Weges. Ein Merkmal von Endosomen sind Rezeptoren, die nach Endozytose wieder zur Plasmamembran zurückgeführt werden (z.B. der Transferrin-Rezeptor-Differenzierung).<sup>iii</sup> Weitere Differenzierungsmöglichkeiten erfolgten auf der Basis funktioneller Kriterien, wie zum Beispiel pH-Wert, Recycling-Aktivität (siehe Kap. 2.6.1) oder ihrer Kinetik bei der Aufnahme von endozytotischen Markern. Aber auch biochemische Marker wurden mit dem Vesikeltransport von der Plasmamembran oder frühen Endosomen assoziiert. So ergaben Fusionsassays *in vitro*, dass verschiedene GTPasen als regulatorische Faktoren im endozytotischen Weg fungieren. Rab 5A/B/C ist an der homotypischen Fusion von frühen Endosomen und dem Transport von der Plasmamembran zu frühen Endosomen beteiligt.<sup>iv</sup> Rab

---

<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (1999), J. Histochem. Cytochem.

<sup>ii</sup> Fra, A.M. et al. (1995), FEBS Lett.

<sup>iii</sup> Gruenberg, J. und Howell, K.E. (1989), Annu. Rev. Cell Biol.

<sup>iv</sup> Gorvel, J.P. et al. (1991), Cell

4A/B kontrolliert dagegen das Recycling aus den Endosomen zur Plasmamembran<sup>i</sup>, und Rab 11 steuert den Transport durch perizentrisomale „recycling endosomes“.<sup>ii</sup> Frühe Endosomen werden auch als „sorting endosomes“ bezeichnet. In der leicht sauren Umgebung (pH 6,3 - 6,8) dissoziieren Rezeptoren und Liganden (z.B. LDL („low density lipoproteins“)) und werden anschließend zu ihren Bestimmungsorten transportiert. Die teils tubuläre, teils vesikuläre Struktur begünstigt dabei diese Sortierung. In den tubulären Bereichen werden Rezeptoren aufkonzentriert, die zur Plasmamembran zurückkehren. Das Recycling zur Plasmamembran folgt dabei dem „bulk flow“ (Membranfluss ohne Sortierungssignal). Die Akkumulation von Liganden erfolgt dagegen in den vesikulären Gebieten. Von hier aus werden aufgenommene Substanzen zu den unterschiedlichen Bestimmungsorten transportiert. Über die Art des Transportweges von Proteinen entscheiden Signalsequenzen in ihrem zytoplasmatischen Teil und die Wechselwirkung mit coat-Proteinen. Abgesehen von Clathrin findet man bei COP-Proteinen (oder deren Homologe)<sup>iii</sup> oder ARF 6<sup>iv</sup> eine Beteiligung am Membranfluss zwischen Plasmamembran und frühen Endosomen. Das nächste Stadium der Endozytose wird durch das Abschnüren von Transportvesikeln markiert. Diese ECV („endocytotic carrier vesicles“) fusionieren weder mit sich selbst noch mit frühen Endosomen, sondern nur mit späten Endosomen.<sup>v</sup> Die Abknospung der ECVs ist coatomer-abhängig, wie durch Markierung mit anti- $\beta$ -COP-Antikörpern gezeigt werden konnte.<sup>vi</sup> Der nachfolgende Transport erfolgt in Abhängigkeit von Mikrotubuli unter Beteiligung von CLIP-170, welches die Bindung der Mikrotubuli an Vesikel vermittelt. Diese von frühen Endosomen abgeschnürten Transportvesikel werden als MVB („multivesicular bodies“) bezeichnet, die auf ihrem weiteren Weg entweder zu späten Endosomen reifen oder als transiente Transportvesikel in späte Endosomen aufgenommen werden. Die späten Endosomen stellen die Verbindung zwischen dem endozytotischen und dem biosynthetischen Weg dar. Über Transportvesikel werden sie vom trans-Golgi-Netzwerk mit sauren Hydrolasen versorgt (siehe Kap. 2.5), welche an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gebunden sind. Späte Endosomen werden zur Unterscheidung von frühen Endosomen auch als prälysosomal

---

<sup>i</sup> van der Sluijs, P. et al. (1992), Cell

<sup>ii</sup> Novick, und Zerial, (1997), Curr. Opin. Cell. Biol.

<sup>iii</sup> Gruenberg, J. und Maxfield, F.R. (1995), Curr. Opin. Cell Biol.

<sup>iv</sup> Peters, J.P. et al. (1994), J. Cell Biol.

<sup>v</sup> Aniento, F. et al. (1993), J. Cell Biol.

<sup>vi</sup> Robinson, M.S. et al. (1996), Cell

bezeichnet, um zu zeigen, dass sie nicht an der endosomalen Sortierung teilnehmen.<sup>i</sup> Außerdem weisen sie schon viele Charakteristika von Lysosomen auf und man findet Aktivitäten von einigen Hydrolasen.<sup>ii</sup>

## 2.5 Lysosomen

Ursprünglich durch biochemische Fraktionierung von Zellextrakten entdeckt, konnten Lysosomen später auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Man fand Lysosomen unterschiedlichster Größen und Formen, was ihre vielfältigen und vielartigen Funktionen im Verdau von intra- und extrazellulären Substraten widerspiegelt. Tierische Lysosomen sind im Durchschnitt ca. 0,2 - 2,0  $\mu\text{m}$  große Organellen. Sie sind von einer besonderen Membran umgeben, in der spezifische Transportproteine die Bausteine von Makromolekülen, wie Aminosäuren oder Zucker aus dem Inneren in das Zytosol der Zelle zur Weiterverwendung zurückführen. Weiterhin findet man in ihrer umgebenden Membran ATP-getriebene Protonenpumpen des V-Typs. Da sie  $\text{H}^+$  in den Lysosomen anreichern, ist der Inhalt der Lysosomen mit einem pH-Wert von 4,5 – 5,0 deutlich saurer als das Zytoplasma (ca. pH 7,0 – 7,3). Die meisten der lysosomalen Membranproteine sind mehrfach glykosyliert, wodurch sie vor den lysosomalen Proteasen im Lumen geschützt sind. Im Inneren finden sich ca. 40 verschiedene saure Hydrolasen (Nucleasen, Proteinasen, Phospholipasen, Glykosidasen u.a.), die alle Arten von Makromolekülen abbauen können. Das Leitenzym der Lysosomen ist die saure Phosphatase. Das pH-Optimum dieser lysosomalen Enzyme ist dem sauren pH-Wert angepasst und liegt ebenfalls im Bereich von pH 5. Bei neutralem pH (wie er z.B. im Zytoplasma herrscht) sind die lysosomalen Enzyme wenig aktiv, was ein Schutzmechanismus der Zelle gegen Selbstverdau sein mag, falls diese Enzyme einmal ins Zytoplasma austreten. Die Hauptaufgabe der Lysosomen ist wie gesagt, der Abbau von Makromolekülen und Zellorganellen. Der Abbau erfolgt zum einen nach Autophagie, wie im Falle von Organellen, die dabei vom Lysosom umschlossen werden (Autophagosom). Das primäre Lysosom wandelt sich dabei zum sekundären um, in dem dann der hydrolytische Abbau stattfindet. Residualkörper enthalten schließlich die unverdaulichen Reste des Abbauprozesses. Ein anderer Abbauvorgang ist die

---

<sup>i</sup> Trowbridge, I.S. et al. (1993), Annu. Rev. Cell Biol.

<sup>ii</sup> Mellman, I. (1996), Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.

Heterophagie, wo Makromoleküle und Partikel zersetzt werden, die durch Endozytose und Phagozytose aufgenommen wurden. Hierbei verschmelzen die Lysosomen mit Endosomen bzw. es „reifen“ späte Endosomen zum Lysosom. Dabei werden aus der Plasmamembran aufgenommene Moleküle in Vesikeln zu kleinen, unregelmäßig geformten Organellen transportiert, die frühe Endosomen genannt werden.<sup>i</sup> Ein Teil wird zur Plasmamembran und zum TGN zurückgeleitet<sup>ii</sup>, während der andere Teil zu späten Endosomen gelangt.<sup>iii</sup> Hier findet man bereits lysosomale Hydrolasen in einer leicht sauren (ca. pH 6) Umgebung, so dass schon jetzt eine hydrolytische Verdauung dieser Moleküle einsetzt. Die weitere Reifung zum Lysosom beinhaltet eine weitere pH Erniedrigung.

Die Bildung primärer Lysosomen erfolgt im Bereich des Golgi-Apparates. Lysosomale Proteine werden am rauen ER gebildet und dort glykosyliert. Anschließend werden im Lumen des Golgi-Apparats endständige Mannose-Reste in einer Zweischritt-Reaktion am C-6 der Mannose phosphoryliert. Zunächst wird hierbei N-Acetylglucosamin-1-phosphat auf die OH-Gruppe am C-6 einer endständigen Mannose übertragen und dann N-Acetylglucosamin wieder abgespalten. Aus diesem Grund tragen auch viele lysosomale Proteine während des Sortierungsprozesses endständige Mannose-6-phosphate (Man-6-P). Diese werden von Man-6-P-spezifischen Rezeptoren des Golgi-Apparates erkannt und gebunden. Die Rezeptoren werden mit Hilfe von Clathrin lokal konzentriert. Das erlaubt ein Abschnüren des

endständige Mannose-6-phosphate (Man-6-P). Diese werden von Man-6-P-spezifischen Rezeptoren des Golgi-Apparates erkannt und gebunden. Die Rezeptoren werden mit Hilfe von Clathrin lokal konzentriert. Das erlaubt ein Abschnüren des

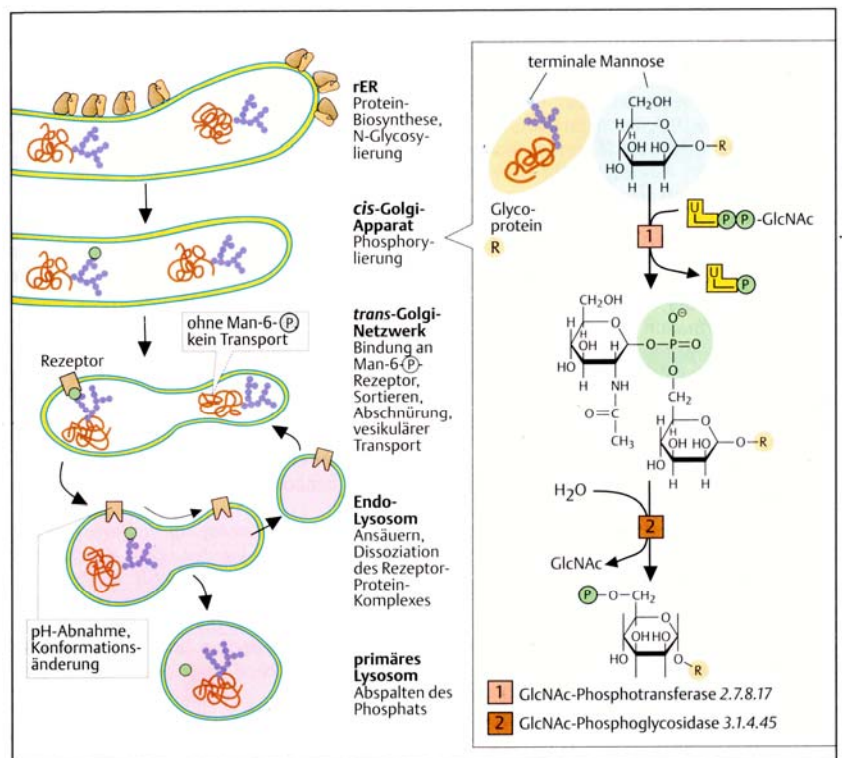


Abbildung 2-6: Bildung und Transport lysosomaler Proteine<sup>v</sup>

<sup>i</sup> Alberts, B. et al. (2002), Garland Science

<sup>ii</sup> Koval, M. und Pagano, R. E. (1989) & (1990)

<sup>iii</sup> Wessling-Resnick, M. und Braell, W. A. (1990)

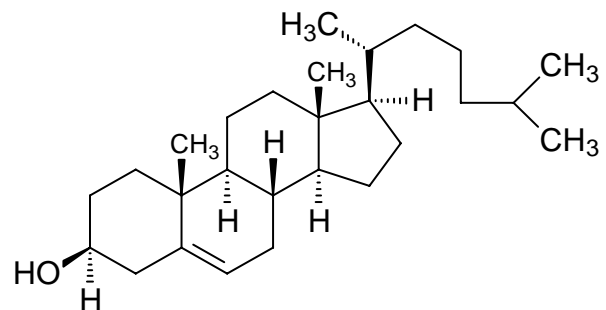
betreffenden Membranabschnittes durch Ausbildung einer Bindungsstelle für den Adaptor AP-1<sup>i</sup> und den Transport durch Transportvesikel zu Endosomen, aus denen durch Reifung primäre Lysosomen entstehen. Schließlich werden die Phosphatgruppen von Man-6-P wieder abgespalten. Durch Absinken des pH-Wertes in den Endosomen werden die Rezeptoren von den gebundenen Proteinen befreit und mit Hilfe von Transportvesikeln zurück zum Golgi-Apparat transportiert.

Viele erbliche Krankheiten beruhen auf genetischen Defekten lysosomaler Enzyme. Dabei ist besonders der Stoffwechsel von Glykogen, Lipiden und Proteoglykanen betroffen. Da die lysosomalen Enzyme für den intrazellulären Abbau unentbehrlich sind, häufen sich bei diesen Krankheiten nicht umgesetzte (Abbau)produkte in den Lysosomen an und führen mit der Zeit zu irreversiblen Zellschädigungen (siehe Kap. 2.8)

## 2.6 Biosynthese der Lipide

### 2.6.1 Cholesterol

Cholesterol gehört zu der Familie der Isoprenoide, deren Synthese von Acetyl-CoA ausgeht. In einer langen Reaktionskette wird aus C<sub>2</sub>-Bausteinen (Acetat) das C<sub>27</sub>-Sterol aufgebaut. Die Biosynthese kann grob in vier Abschnitte



eingeteilt werden. Im ersten entsteht aus drei Acetyl-CoA das Mevalonat, eine C<sub>6</sub>-Verbindung. Die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA und weiter zum 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA entspricht dem Biosyntheseweg der Ketonkörper. Allerdings findet er im Gegensatz dazu nicht in den Mitochondrien, sondern im Zytosol statt. Der nächste Schritt ist die Abspaltung der HMG Gruppe vom CoA und gleichzeitiger Reduktion durch die *HMG-CoA-Reduktase* zu Mevalonat. Die Steuerung dieses Schlüsselenzyms erfolgt durch Repression der Transkription (Effektoren: Oxysterol, wie Cholesterol) oder Interkonversion (Effektoren: Hormone).

<sup>i</sup> Robinson, M.S. et al. (1996), Cell

<sup>v</sup> Koolman, J. und Röhm, K.H. (2003) Thieme

Eine Stimulation des Enzyms kann durch Insulin oder Thyroxin erfolgen, wohingegen es durch c-AMP-abhängige Phosphorylierung oder Glucagon gehemmt wird.

Im zweiten Abschnitt wird Mevalonat in Isopentenyl-diphosphat umgewandelt. Dieses erfolgt nach Phosphorylierung unter ATP-Verbrauch durch Decarboxylierung. Damit ist der Baustein aller Isoprenoide gebildet.

Die Verknüpfung von fünf dieser „aktiven“ Isoprene zum Squalen geschieht im dritten Abschnitt. Aus Isopentenyl-diphosphat entsteht durch Isomerisierung Dimethylallyl-diphosphat, welches wiederum mit IDP zu Geranyl-diphosphat kondensiert. Die Addition eines weiteren IDP-Moleküls führt zu Farnesyl-diphosphat. Dieses kann durch eine „Kopf-an-Kopf“-Reaktion zu Squalen dimerisieren.

Zum Schluss wird im letzten Abschnitt unter  $O_2$ -Verbrauch Squalen zu Lanosterol cyclisiert. Aus diesem  $C_{30}$ -Sterol werden dann in 19 Schritten (teilweise unter Katalyse von Cytochrom-P450-Systemen) drei Methylgruppen oxidativ abgespalten.<sup>i</sup>

Der gesamte endergone Biosyntheseweg ist im glatten ER lokalisiert. Die benötigte Energie stammt aus den beteiligten CoA-Derivaten und ATP.

Die körpereigene Biosynthese des Cholesterols findet sowohl im Darm, als auch in der Haut, sowie im Hirn, vor allem aber in der Leber ( $\geq 50\%$ ) statt. Der größte Teil des Cholesterols wird in die Lipidschicht der Plasmamembranen inseriert oder zu Gallensäuren umgebaut. Die peripheren Gewebe nehmen den größten Teil des Cholesterols, welches sie nicht selber synthetisieren, durch rezeptorvermittelte Endozytose aus LDL (low density lipoproteins) auf. In den Zellen werden die Cholesterolester von einer lysosomalen Lipase hydrolysiert und das Cholesterol freigesetzt. Die LDL-Rezeptoren werden im ER synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und anschließend als Bestandteil von Stachelsaumvesikeln in die Plasmamembran eingebaut. Lipoproteine geringer Dichte (LDL) binden spezifisch an diese Rezeptoren und werden in die Endosomen der Zelle internalisiert. Von dort werden die LDL-Rezeptoren recycelt und zur Plasmamembran zurücktransportiert, während das LDL zum Lysosom weitergereicht wird.

Die Biosynthese und der Transport von Cholesterol werden über drei verschiedene Schritte exakt reguliert. Zum einen findet man eine Abhängigkeit der LDL-Rezeptorsynthese von der intrazellulären Cholesterolkonzentration, welche bei hoher Konzentration unterdrückt und bei niedriger stimuliert wird. Zum anderen erfolgt

---

<sup>i</sup> Rilling, H.C. und Chayet, L.T. (1985), Elsevier

eine Regulation über die Geschwindigkeit, mit der Cholesterol verestert wird. Das Enzym dieser Veresterung, die *Acyl-CoA:Cholesterol-Acyl-Transferase (ACAT)*, wird dabei durch reversible Phosphorylierung und Langzeitkontrolle reguliert.<sup>i</sup> Der wichtigste Regulationspunkt ist jedoch die *HMG-CoA-Reduktase*, da sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Biosynthese katalysiert. Dieses Enzym liegt in zwei Formen vor, welche ineinander umwandelbar sind. Man findet eine unmodifizierte und eine phosphorylierte Form. Letztere ist dabei die weniger aktive. Die Umwandlung erfolgt hierbei ausgehend von der nicht phosphorylierten Form in einem bicyclischen Kaskadensystem mittels der *HMG-CoA-Reduktase-Kinase (RK)*. Die Reaktivierung (Dephosphorylierung) wird durch *Phosphoprotein-Phosphatase-1 (PPI-1)* katalysiert. Beide Reaktionen werden durch cAMP abhängige Kinasen katalysiert (es gibt jedoch auch noch eine cAMP unabhängige *Reduktase-Kinase-Kinase (RKK)*). Auf Grund der Beziehung zwischen Phosphorylierungsgrad der *HMG-CoA-Reduktase* und der cAMP-Konzentration steht die Aktivität der *HMG-CoA-Reduktase* und damit auch die Cholesterolsynthese unter hormoneller Kontrolle.<sup>ii</sup> Wie oben erwähnt, bewirkt Insulin eine Abnahme des cAMP-Spiegels und stimuliert somit die Synthese, während Glucagon durch Erhöhung der cAMP-Konzentration hemmend wirkt.

In jüngster Zeit konnte auch der Einfluss von Leber X Rezeptoren (LXR  $\alpha$  und LXR  $\beta$ ) auf den Cholesterolfstoffwechsel nachgewiesen werden. LXR fungieren als Cholesterol Sensoren, die die Expression verschiedener Gene (ABCA1, ABCG1, apoE und PLTP)<sup>iii</sup> regulieren, welche an der Absorption, an der Ausscheidung und am Transport von Cholesterol beteiligt sind. Die endogenen Aktivatoren der LXR sind Oxysterole und Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese.<sup>iv</sup> Weiterhin konnte eine pathophysiologische Bedeutung dieser Rezeptoren an der Entstehung metabolischer Störungen gezeigt werden. So inhibieren synthetische LXR Agonisten die Entwicklung von Arteriosklerose in Mausmodellen, wohingegen eine verminderte LXR Expression zu einem deutlichen Anstieg dieser Krankheit führte.<sup>v</sup>

---

<sup>i</sup> Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1985), *Curr. Top. Cell. Regul.*

<sup>ii</sup> Voet, D., Voet J.G. (1990), Wiley

<sup>iii</sup> Repa, J.J. und Mangelsdorf, D.J. (2002), *Nat. Med*

<sup>iv</sup> Tontonoz, P. und Mangelsdorf, D.J. (2003), *Mol. Endocrinol*

<sup>v</sup> Joseph, S.B. und Tontonoz, P. (2003), *Curr. Opin. Pharmacol.*

### 2.6.2 Diacylglycerolphospholipide

Zusammengesetzte Lipide, wie die Neutralfette (Triacylglycerole) oder Phospholipide, werden über gemeinsame Reaktionswege aufgebaut. Die meisten der beteiligten Enzyme sind mit den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums assoziiert. Glycerol-3-phosphat, die Ausgangsverbindung, kann dabei auf zwei Wegen entstehen. Zum einen durch Reduktion aus dem Glykolyse-Zwischenprodukt Glycerinaldehyd-3-phosphat oder durch Phosphorylierung des aus dem Fettabbau stammenden Glycerols. Die Veresterung des Glycerol-3-phosphats mit einer langkettigen Fettsäure ergibt ein stark amphipathisches Lysophosphatid, woraus durch erneute Acylierung ein Phosphatidat entsteht. Ausgehend von den Anionen der Phosphatidsäuren setzen alle weiteren Biosynthesen von Fetten und Phospholipiden an.

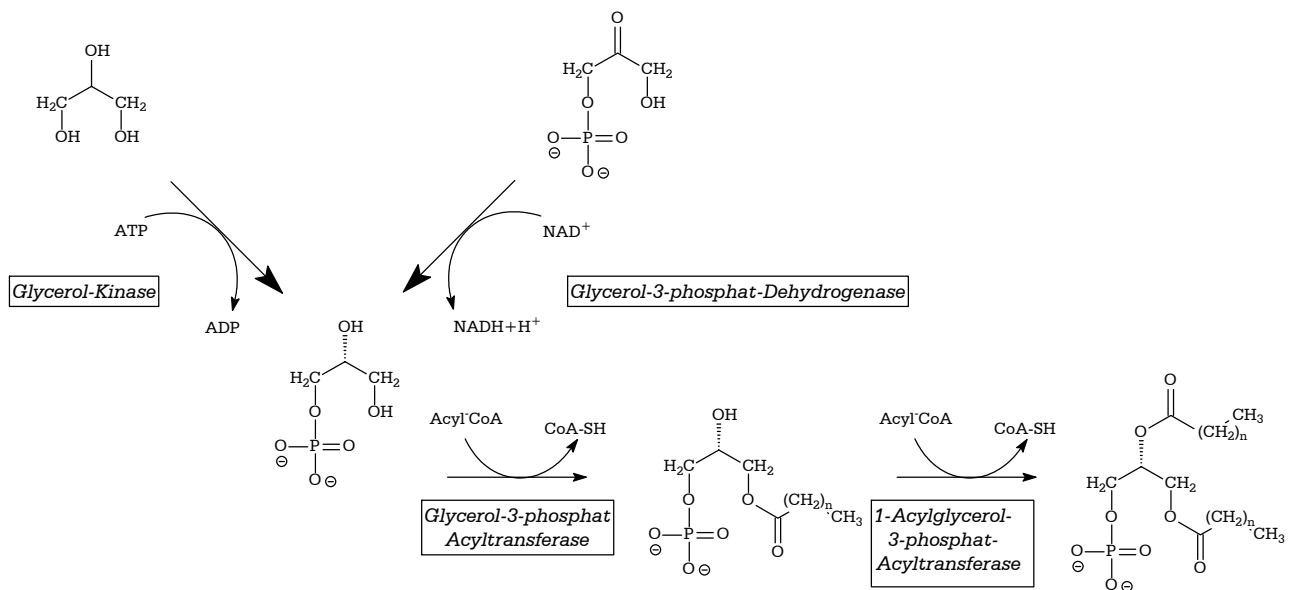


Abbildung 2-7: Biosynthese von Phosphatidat

Durch hydrolytische Spaltung (*Phosphatidat-Phosphatase*) wird der Phosphatrest wieder abgetrennt, und man erhält Diacylglycerol (DAG) und durch Übertragung eines weiteren Acylrests (nach gleichem Schema, *Diacylglycerol-Acyltransferase*) ist durch die Bildung von Triacylglycerol die Bildung der Neutralfette abgeschlossen. Sie werden mittels vLDL aus der Leber ins Blut transportiert und in Adipocysten letztendlich als unlösliche Fett-Tröpfchen gespeichert.



Ebenfalls ausgehend von DAG werden Phosphatidylcholin (PC=Lecithin) und Phosphatidylethanolamin (PE) gebildet. Zuerst werden jedoch Ethanolamin oder Cholin durch ATP phosphoryliert (*Ethanolamin- bzw. Cholin-Kinase*). Das Produkt greift CTP an und verdrängt  $PP_i$ , wodurch die aktivierten Phosphatester (CDP-Derivate) entstehen (*Phosphoryethanolamin- bzw. Phosphorylcholin-Cytidin-Transferase*). Letztendlich greift die C-3-OH-Gruppe von DAG die Phosphorylgruppe der CDP-Derivate an und CMP wird abgespalten (*1,-Alkyl-2-Acetylglycerol-ethanolamin-(bzw. cholin)-phosphotransferase*).<sup>i</sup>

Die Biosynthese von Phosphatidylinositol (PI) geht nicht von DAG, sondern von den Phosphatidaten aus. Durch Übertragung eines CMP-Restes auf DAG entsteht zunächst ein aktiviertes CDP-Diacylglycerol und  $PP_i$  (*Phosphatidat-Cytidyltransferase*).<sup>ii</sup>

Die Substitution des CMP durch Inositol liefert dann PI (*CDP-Diacylglycerol-Inositol-3-Phosphatidyltransferase*).

Weitere Reaktionen dienen dazu, Phospholipide ineinander umzuwandeln, wie z.B. Phosphatidylserin durch Austausch der Kopfgruppe aus PE (*PE:Serin-Transferase*).<sup>iii</sup>

An dem C-2 des Glycerols findet man überwiegend ungesättigte Acylreste (vor allem Ölsäure ( $CH_3(CH_2)_7CH:CH(CH_2)_7COOH$ )). Während am C-1 bevorzugt gesättigte Fettsäuren gebunden sind. Dies erklärt jedoch nicht, dass während im Gehirn ca. 80% des PI eine Stearylgruppe am C-1 und eine Arachidonylgruppe am C-2 tragen, sich in der Lunge bei ca. 40% des PC an beiden Positionen Palmitinsäurereste befinden. Derartige Seitenkettenspezifitäten werden durch „Remodellierung“ erzeugt. Dabei tauschen unter Beteiligung von Phospholipasen, Acyltransferasen bestimmte Acylgruppen aus.<sup>iv</sup>

---

<sup>i</sup> Thiele, O.W. (1968), Hippokrates

<sup>ii</sup> Lykidis A. und Jackowski S. (2001), Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.

<sup>iii</sup> Mozzi R. et al. (2003), Neurochem. Res.

<sup>iv</sup> Okuyama H. et al. (1983), Arch. Biochem. Biophys.

**2.6.4 Cardiolipin und BMP**

Cardiolipin ist ein „doppeltes“ Phospholipid mit vier Fettsäuren in seinem hydrophoben Teil. Phosphatidylglycerophosphat-Synthase katalysiert dabei den ersten Schritt der Biosynthese. Aus 1-(Cystidin-5'-diphosphoryl)diacylglycerol (CDP-DAG) entsteht durch Ersetzen einer CMP-Einheit durch L-Glycerol-3-phosphat Phosphatidylglycerophosphat. Nach anschließender Dephosphorylierung setzt eine *Cardiolipin-Synthase* das entstandene Phosphatidylglycerol mit CDP-DAG zu Cardiolipin um.<sup>i</sup>

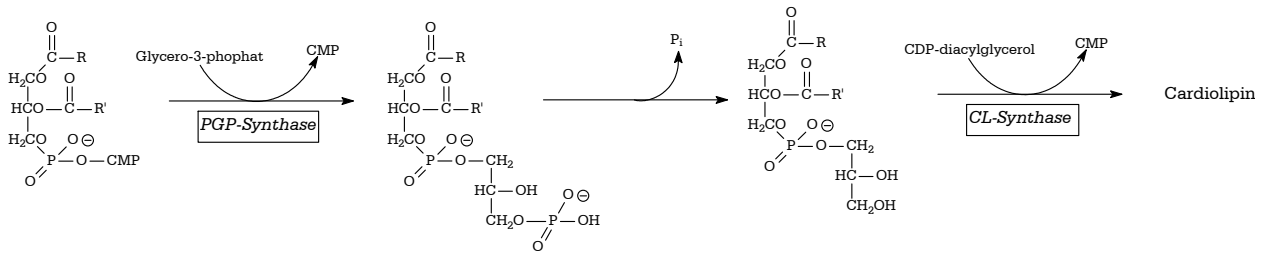
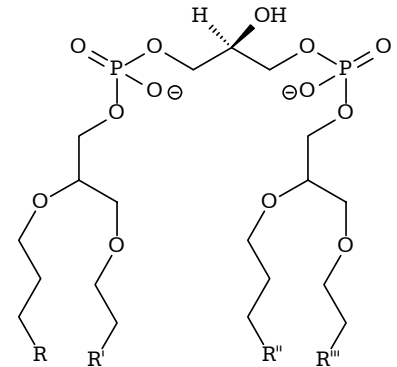
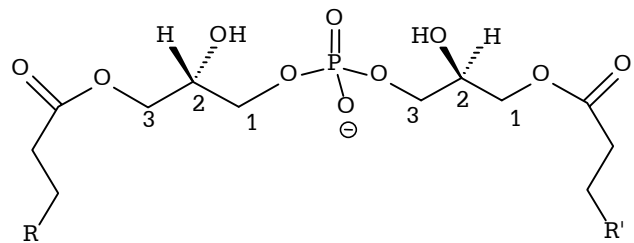


Abbildung 2-8: Biosynthese von Cardiolipin

Der gesamte Vorgang ist in Säugerzellen *in vivo* in den Mitochondrien lokalisiert, wo auch die höchste Aktivität und das höchste Vorkommen von *Phosphatidylglycerophosphat-Synthase* und *Cardiolipin-Synthase* gefunden werden.<sup>ii</sup> Den höchsten anteilmäßigen (an Phospholipiden) Cardiolipingehalt (9-15 %) findet man in den Mitochondrien der Herzmuskulatur, in der vermutlich die mitochondriale Energieproduktion eine wichtige Rolle für die Funktion des Herzens spielt.

Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) wurde erstmals 1967 als Bestandteil alveolarer Makrophagen erwähnt. In natürlichem BMP findet man hauptsächlich statt einer *sn-3* eine *sn-1*-



<sup>i</sup> Kawasaki, K. et al. (2001), Biochem. J.

<sup>ii</sup> Schlame, M. und Hostetler, K.Y. (1997), Biochim. Biophys. Acta

Konfiguration am Glycerol-phosphat-ester, die im Laufe der Biosynthese erzeugt wird. Die Biosynthese von BMP ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber man geht davon aus, dass es als Intermediat bei dem lysosomalen Abbau von Phosphatidylglycerol und von Cardiolipin entsteht.<sup>i</sup>

#### **2.6.4 (Glyko-)sphingolipide**

Der erste Schritt in der Biosynthese der Sphingolipide ist der Aufbau des Ceramid-Ankers auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Reticulums. Die Serin-Palmitoyltransferase ermöglicht die Bildung von 3-Dehydrosphinganin aus L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A.<sup>ii</sup> Die anschließende Reduktion durch die 3-Dehydrosphinganin-Reduktase und NADPH zu D-erythro-Sphinganin ist ebenso membranlokalisiert wie die nachfolgende Acylierung zu D-erythro-Dihydroceramid durch die Sphinganin-N-Acyltransferase.<sup>iii</sup> Die Ceramidbildung erfolgt anschließend durch die Dihydroceramid-Desaturase, die in 4,5-Position eine Doppelbindung einführt.<sup>iv</sup>

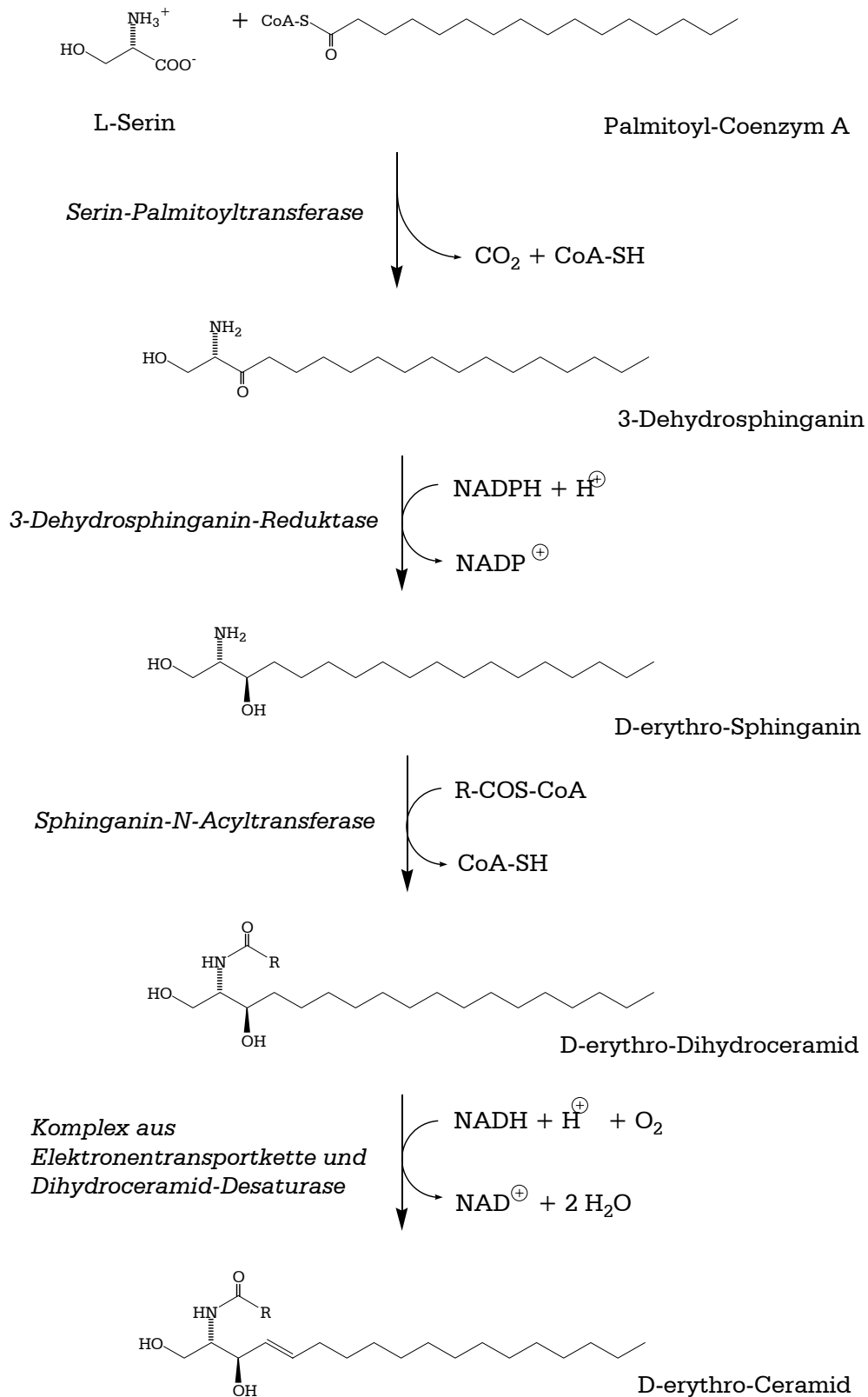
---

<sup>i</sup> Amidon, B. et al. (1996) Biochemistry

<sup>ii</sup> Braun, P.E. und Snell, E. E. (1968), J. Biol. Chem.

<sup>iii</sup> Sandhoff, K: und van Echten, G. (1993), Adv. Lipid Res.

<sup>iv</sup> Rother, J., et al. (1992), Biochem. Biophys. Res. Commun.

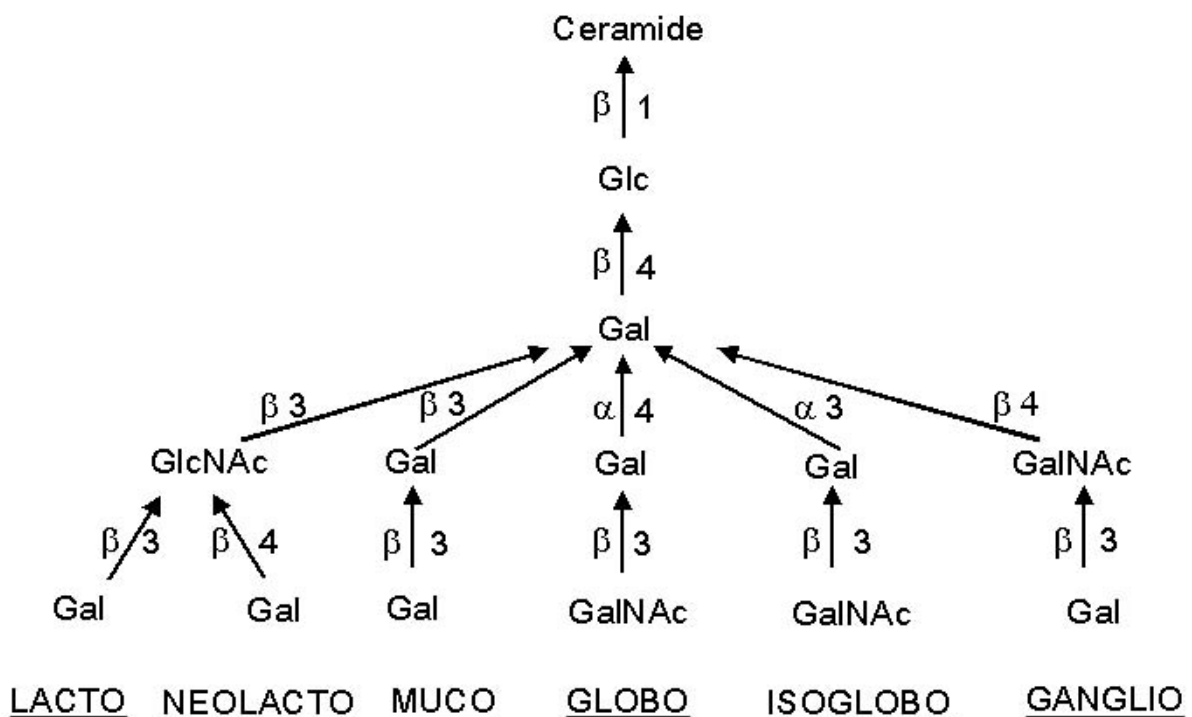


**Abbildung 2-8:** Biosynthese der Sphingolipide - Synthese von D-erythro-Ceramid, ausgehend von L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A.

Experimente mit radioaktiv-markiertem Serin<sup>i</sup> und fluoreszenzmarkiertem NBD-Dihydroceramid<sup>ii</sup> lassen vermuten, daß die Dehydrierung vom Dihydroceramid zum Ceramid nicht zwingend erfolgt. Zwar weisen die meisten Sphingolipide einen Ceramidanker auf, allerdings kann dieser auch aus einem zweiten Weg neben der *de novo*-Synthese entstehen. Für den Fall, dass nicht alles Dihydroceramid desaturiert wird, kann aus dem Abbau von Sphingomyelin und Glykosphingolipiden in Lysosomen, Sphinganin oder Sphingosin wiedergewonnen und der Biosynthese im Endoplasmatischen Reticulum (ER) erneut zugeführt werden.

In Säugerzellen werden Ceramide zu Sphingomyelin und Glucosylceramid metabolisiert. Die Sphingomyelin-Synthese ist auf der luminalen Seite der Golgi-Membran lokalisiert.<sup>iii</sup> Sphingomyelin wird durch die Übertragung eines Phosphorylcholinrestes von Phosphatidylcholin auf das Ceramid gebildet.

Nach der Synthese von Ceramid verzweigt sich der Syntheseweg der Sphingolipide. Während Sphingomyelin auf der luminalen Seite des cis-Golgi-Apparates gebildet wird, erfolgt auf der zytosolischen Seite von Golgimembranen eine Glykosylierung



**Abbildung 2-9:** Schema der Glykolipid-Reihe (Struktur und Namen wie durch Wiegandt beschrieben)<sup>iv</sup>

<sup>i</sup> Smith, E. R. und Merill, A. H. jr. (1995), J. Biol. Chem.

<sup>ii</sup> Kok, J. W. Et al. (1991), J. Cell Biol.

<sup>iii</sup> Futerman, A. H. et al. (1990), J. Biol. Chem.

<sup>iv</sup> Wiegandt, H (1968), Angew. Chem. Int. Ed. Engl.

von Ceramid mit UDP-Glucose.<sup>i</sup> Ob dieser Vorgang ausschließlich in cis-Golgi-Kompartimenten erfolgt, kann noch nicht eindeutig beantwortet werden, da sowohl in frühen (CGN, cis), als auch in späten Golgi-Kompartimenten (medial, trans) Glucosyltransferaseaktivitäten festgestellt werden konnten.<sup>ii</sup> Ein Teil des neusynthetisierten Glucosylceramids transloziert nach der Glycosylierung von der zytosolischen zu der luminalen Seite des cis-Golgi-Apparats. Jedoch wird eine beträchtliche Menge der Glucosylceramide direkt zur Plasmamembran transportiert, wo sich ein großer Anteil (bis zu 45%) des zellulären Glucosylceramids befindet.<sup>iii</sup> So zeigte sich, dass in der Epidermis die Glucosylceramide und andere Probarrierelipide in den „lamellar bodies“ angereichert und zum *stratum corneum* transportiert werden. In neuester Zeit konnte gezeigt werden, dass aus dem Probarrierelipid Glucosylceramid und aus Sphingomyelin die entsprechenden Ceramide des *stratum corneum* gebildet werden.<sup>iv</sup>

Alle weiteren Glykosylierungsschritte finden hingegen auf der luminalen Seite des Golgi-Apparates statt<sup>v</sup>, wo in frühen Golgi-Zisternen Laktosylceramid synthetisiert wird.<sup>vi</sup> Wie Glucosylceramid auf die luminale Seite gelangt, ist noch unbekannt. Glykosphingolipide können auf Grund der Verknüpfungen ihrer Zuckerbausteine in verschiedene Reihen eingeteilt werden. Laktosylceramid ist hierbei ein Verzweigungspunkt in der Biosynthese dieser Glykosphingolipide. Wird eine weitere Galaktoseeinheit durch Knüpfen einer  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung eingeführt, erhält man Globotriaosylceramid (GbOse<sub>3</sub>Cer), einen Vertreter der sogenannten Globo-Reihe. Erfolgt zuerst eine Einführung einer Sialinsäure an den Galaktoserest des Laktosylceramids, führt dies zum Gangliosid GM3<sup>vii</sup>, dem ersten Vertreter der Lipide der Ganglio-Reihe.

---

<sup>i</sup> Jeckel, D. et al. (1992), J. Biol. Chem.

<sup>ii</sup> Jeckel D. und Wieland, F. (1993), Adv. Lip. Res.

<sup>iii</sup> Klenk, H.D. und Choppin, P.W. (1970), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<sup>iv</sup> Hamanaka S. et al. (2002), J. Invest. Dermatol.

<sup>v</sup> Yusuf, H. K. M. et al. (1983a), Proc. Natl. Acad. Sci. & (1983b), Eur. J. Biochem.

<sup>vi</sup> Trinchera M. et al. (1991), Biochemistry

<sup>vii</sup> Svennerholm, L. (1963), J. Neurochem.

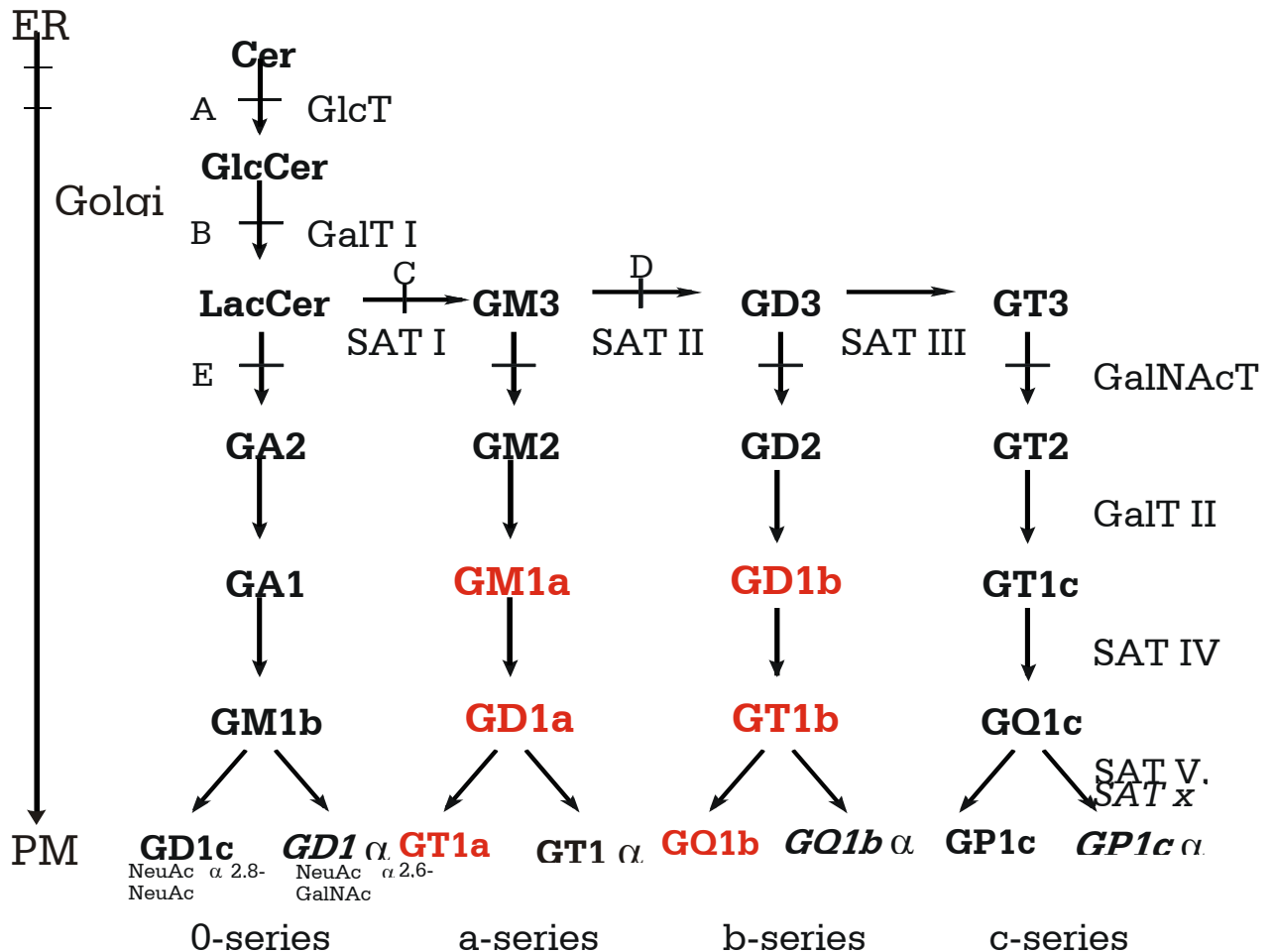


Abbildung 2-10: Aufbau der Gangliosid-Reihe, ausgehend von LacCer<sup>iii</sup>. Rot gekennzeichnet sind die Hauptganglioside des menschlichen Hirns

Nach heutigen Erkenntnissen werden die GSL vesikulär von den cis- über die medialen- zu den trans-Kompartimenten transportiert.<sup>i</sup> Rückschlüsse auf die Syntheseorte konnten durch metabolische Bindungsstudien in kultivierten Zellen gewonnen werden. Durch Verwendung von Transportinhibitoren konnte gezeigt werden, dass Laktosylceramid, GM3 und GD3 in funktionell frühen Golgi-Kompartimenten synthetisiert werden, während die komplexen Ganglioside (GM2, GM1, etc.) vermutlich im trans-Golgi-Netz (TGN) entstehen. So stört Monensin den vesikulären Fluss zwischen cis- und trans-Golgi-Zisternen. Man findet ein vereinfachtes Glykosylierungsmuster aus fast ausschließlich den einfach aufgebauten GSL, wie Glucosyl- oder Laktosylceramid, GM3 und GD3. Komplexe Glykosphingolipide wie GM2, GM1 oder GD1a traten nur in geringem Maße auf.<sup>ii</sup> Ein

<sup>i</sup> Wieland, F. (1987), Cell

<sup>ii</sup> Schwarzmann et al. (1995), J. Biol. Chem.

<sup>iii</sup> Pohlentz, G. et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

ähnliches Verhalten kann auch durch Zugabe von Brefeldin A, einem Pilzmetaboliten,<sup>i</sup> erreicht werden. Dieser bewirkt eine Verschmelzung von Golgi-Membranen mit dem ER, wodurch der Vesikeltransport zum TGN unterbrochen wird.<sup>iii</sup> Vom TGN zur Plasmamembran erfolgt der Transport der GSL ebenfalls vesikulär.<sup>ii</sup>

## 2.7 Abbau der (Glyko-)Sphingolipide im Lysosom

Teile der Plasmamembran gelangen nach Endozytose mittels vesikulärem Fluss durch die frühen und späten Endosomen in die Lysosomen.<sup>iii</sup> Hier werden durch saure Hydrolasen<sup>iv</sup> unter Mitwirkung von Aktivatorproteinen<sup>v</sup> der Oligosaccharidbaum der GSL sukzessiv vom nicht reduzierenden Ende her abgebaut. Für den Abbau von Sphingolipiden mit weniger als vier Monosaccharideinheiten benötigen die entsprechenden Hydrolasen Cofaktoren, sogenannte Sphingolipid-Aktivatorproteine. Ein Defekt der am Abbau beteiligten Enzyme oder deren Aktivatorproteine führt zu einer Speicherung des entsprechenden Lipidsubstrates und zum Krankheitsbild der Sphingolipidosen.

Diese Sphingolipid-Aktivatorproteine (SAP) fungieren zum Teil als „Liftnasen“ für die membrangebundenen Glykolipide und ermöglichen so den weiteren enzymatischen Abbau. SAPs sind kleine, hitzestabile und enzymatisch nicht aktive Glykoproteine. Bis heute sind fünf solcher Aktivatorproteine bekannt, von denen vier (SAP A-D) durch proteolytisches Prozessieren eines gemeinsamen Vorläuferproteins (SAP-Vorläufer, Prosaposin) gebildet werden. Die Funktionen der verschiedenen SAPs sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei *in vitro* Experimenten hat man für SAP-A eine Stimulierung des Abbaus durch Glucosylceramidase und Galaktosylceramidase gefunden.<sup>vi</sup> *In vivo* scheint es am Abbau von Galaktosylceramid und Galaktosylsphingosin beteiligt zu sein.<sup>vii</sup> Für SAP-B fand sich *in vitro* eine Stimulation des Abbaus zahlreicher Lipide. Dabei hat sich gezeigt, dass saure Lipide wie BMP

---

<sup>i</sup> Van Echten G. et al. (1990), Eur. J. Cell. Biol.

<sup>ii</sup> Lipsky, N. G. und Pagano, R. E. (1985), J. Cell Biol.

<sup>iii</sup> Griffith, G. et al. (1988), Cell

<sup>iv</sup> Gatt, S. (1970), Chem. Phys. Lipids / Sandhoff, K. (1977), Angew. Chem.

<sup>v</sup> Conzelmann, E. et al. (1988) Lipid Storage disorders: Biological and Medical Aspects.

<sup>vi</sup> Morimoto, S. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<sup>vii</sup> Harzer, K. et al. (2001), FEBS Lett.



den aktivierenden Effekt von SAP-B stark erhöhen.<sup>i</sup> Durch Immunogoldmarkierungen von Kryoschnitten konnte BMP gehäuft in intravesikulären und –lamellaren Membranen lokalisiert werden. Auf der limitierenden Membran hingegen konnte es nicht gefunden werden.<sup>ii</sup> Studien innerhalb unserer Abteilung haben gezeigt, dass BMP den Abbau von Gangliosiden (GM1, GM2),<sup>iii</sup> Sphingomyelin, Glucosylceramid<sup>iv</sup> und Ceramid<sup>i</sup> stark stimuliert. *In vivo* spielt SAP-B eine essentielle Rolle beim Abbau von Sulfatiden. Die physiologische Bedeutung von SAP-C liegt in der Stimulierung des Glucosylceramidabbaus durch die lysosomale Glucosylceramidase. Außerdem fand man *in vitro* eine Stimulation des Ceramidabbaus durch die saure Ceramidase,<sup>v</sup> sowie des Sphingomyelinabbaus durch die saure Sphingomyelinase.<sup>vi</sup> Ebenso konnte auch *in vivo* für SAP-D eine Stimulierung des Ceramidabbaus nachgewiesen werden. Kommt es durch einen genetischen Defekt zu einem Fehlen des SAP-Vorläufers, und damit auch zu einer Aktivatordefizienz, führt das zu einer massiven lysosomalen Speicherung der Glykolipide mit kurzen Zuckerbausteinen (Glucosylceramid, Laktosylceramid) und Ceramid, sowie zu vermehrter Ausbildung multivesikulärer Strukturen in den Lysosomen (siehe Kapitel 2.8).<sup>vii/viii</sup>

Nach dem Abbau des Zuckerbaums wird der verbleibende Ceramid-Anker durch die lysosomale saure Ceramidase in Sphingoidbase und Fettsäure gespalten.<sup>ix</sup> Die Spaltprodukte verlassen nun vermutlich über Trägermoleküle („carrier“) die Lysosomen, um entweder der Neusynthese von Makromolekülen („salvage pathway“) zugeführt zu werden oder der Energiegewinnung zu dienen.<sup>x</sup> So konnte gezeigt werden, dass Sphingosin oder Sphinganin im ER durch die Sphinganin N-Acyltransferase wieder acyliert werden oder im Zytosol phosphoryliert und anschließend im ER durch die Sphingosin-Phosphat-Lyase in Ethanolamin-Phosphat und Aldehyd gespalten werden.

---

<sup>i</sup> Wilkening, G. et al. (2000), J. Biol. Chem.

<sup>ii</sup> Kobayashi T. et al. (2001), Biol. Chem.

<sup>iii</sup> Werth N. et al. (2001), J. Biol. Chem.

<sup>iv</sup> Wilkening, G. et al. (2000), J. Biol. Chem.

<sup>v</sup> Linke, T. et al. (2001), J. Biol. Chem.

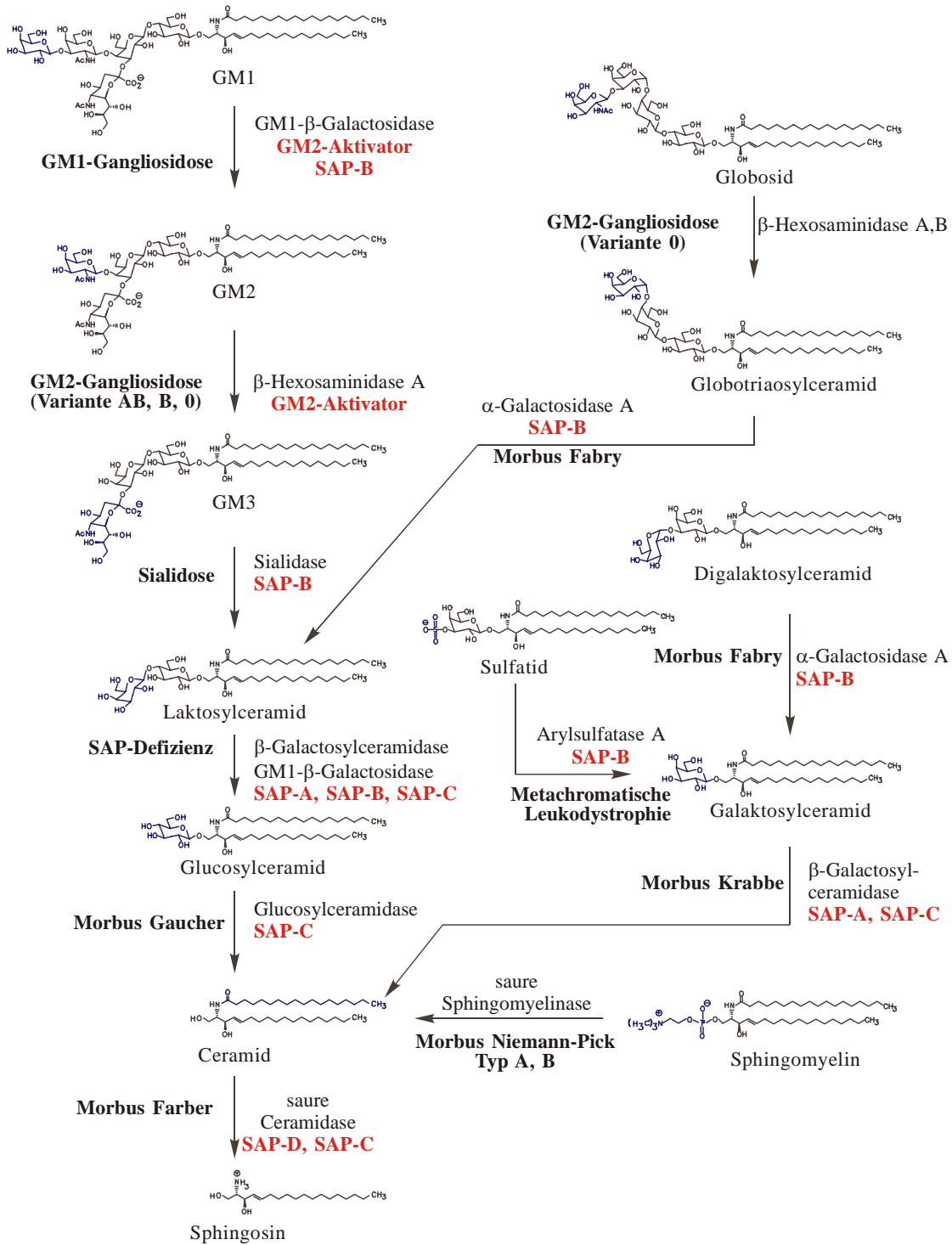
<sup>vi</sup> Linke, T. et al. (2001), Biol. Chem.

<sup>vii</sup> Bradová V. et al. (1993) Hum. Genet.

<sup>viii</sup> Schnabel, D. et al. (1992), J. Biol. Chem.

<sup>ix</sup> Gatt. S. (1966), J. Biol. Chem.

<sup>x</sup> Schwarzmann, G. et al. (1986), Enzymes of lipid metabolism II.



**Abbildung 2-11:** Abbauschema der Glykosphingolipide, der beteiligten Enzymen sowie den in vivo benötigten Sphingolipid-Aktivatorproteine.<sup>i</sup>

Der Abbauprozess der GSL in den Lysosomen lässt jedoch noch einige Fragen offen. Die lysosomale Membran ist auf ihrer Innenseite von einer ausgedehnten, sehr dichten Glykokalix (bestehend aus lysosomalen membranassoziierten (LAMP) und

<sup>i</sup> Kolter, T. und Sandhoff, K. (1999), Angew. Chemie

integralen (LIMP) Membranglykoproteinen) gegen den Selbstverdau geschützt.<sup>i</sup> Es ist daher schwer vorstellbar, dass abzubauende Membranfragmente zunächst mit der lysosomalen Membran fusionieren und dann selektiv einzelne Lipide aus dieser Glykokalix abgebaut werden. Ein plausibleres Modell beschreibt den Abbau der Glykolipide als Bestandteil intraendosomaler bzw. intralysosomaler Vesikel im Lysosol. In dieser alternativen Betrachtungsweise werden sie bereits in den Endosomen durch Abschnürung von Membranelementen zu intraendosomalen Vesikeln.<sup>ii/iii</sup> Diese gelangen durch nachfolgende Reifungsprozesse oder durch einen vesikulären Transport entlang des endozytotischen Weges ins Innere von präexistierenden Lysosomen.<sup>iv</sup> Solche Vesikel lassen sich bereits auf der Stufe der frühen Endosomen nachweisen.<sup>v</sup> Weitere Hinweise auf solche „multivesikulären Körper“ als Abbauort der GSL findet man z.B. beim Abbau des EGF-Rezeptors. Dieser wird nach der Endozytose nicht in die Perimetermembran inseriert, sondern reichert sich in intraendosomalen Vesikeln des frühen und späten Endosoms an, die im Lysosom abgebaut werden.<sup>vi</sup> Ebenso konnten in Kupfferzellen und Fibroblasten von Patienten mit SAP-Vorläufer-Defizienz vermehrt lysosomale Speichervesikel gefunden werden,<sup>vii</sup> die immunocytochemisch als spätendosomale/lysosomale bzw. reversible Speicherorganelle identifiziert werden konnten.<sup>viii</sup>

## 2.8 Lipidspeichererkrankungen

Der Abbau von Zellkomponenten erfolgt wie erwähnt in Lysosomen. Kommt es zu Störungen im erläuterten Abbauweg, führt dies zu mehr oder weniger gravierenden Krankheiten. In der Vergangenheit wurden häufig grundlegende Mechanismen der lysosomalen Funktionen durch Analyse von Defekten des lysosomalen Abbaus aufgeklärt. So sind ca. 30 lysosomale Speicherkrankheiten bekannt, die durch einen genetischen Defekt oder eine lysosomale Proteindefizienz hervorgerufen werden, wobei nicht nur der Defekt einer lysosomalen Hydrolase, sondern auch eine Störung

---

<sup>i</sup> Lewis, V. et al. (1985), J. Cell Biol.

<sup>ii</sup> Fürst, W. und Sandhoff, K. (1992), Biochim. Biophys. Acta

<sup>iii</sup> Felder, S. et al. (1990), Cell

<sup>iv</sup> van Deurs, B. et al. (1989) International Review of Cytology

<sup>v</sup> McKanna, J.A. et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<sup>vi</sup> Renfrew, C. A. und Hubbard, A. I. (1991), J. Biol. Chem.

<sup>vii</sup> Harzer, K. et al. (1989), Eur. J. of Pediatr.

<sup>viii</sup> Burkhardt, J. et al. (1997), Eur. J. Cell. Biol.

von Transport-, Schutz- und Aktivatorproteinen zu einer Erkrankung führen kann. Die Klassifizierung lysosomaler Speicherkrankheiten wird durch den betroffenen Stoffwechselweg oder die Art des auflaufenden Substrates charakterisiert (z.B. Mucopolysaccharidosen, Sphingolipidosen, Mucopolysaccharidosen oder Glykoprotein- und Glykogenspeichererkrankungen). Lipidosen sind Speicherkrankheiten, die durch Defekte des Sphingolipidkatabolismus hervorgerufen werden. Häufig findet man hierbei membranöse Ablagerungen als Vesikel oder Lipidlamellen, den „Zebra Bodies“, die elektronenmikroskopisch in vergrößerten Organellen (Lysosomen) nachgewiesen werden konnten. Im Allgemeinen sind die Erkrankungen heterogen und unterscheiden sich nur durch den Beginn der Erkrankung und das Fortschreiten des klinischen Befundes. Ebenso führen oft auch die unterschiedlichsten biochemischen Defekte zu einem Krankheitsbild mit klinisch gleichen Symptomen.<sup>i</sup> Im Anschluss findet sich eine Beschreibung der häufigsten und wichtigsten bzw. der in folgenden Kapiteln erwähnten Lipidspeicherkrankheiten.

*Gaucher*: Ein Defekt der  $\beta$ -Glucocerebrosidase (GC) führt zu der häufigsten lysosomalen Speicherkrankheit, der Gaucher'schen Erkrankung. Ist das Enzym nur teilweise defekt findet man keine oder weniger gravierende Krankheitssymptome. Bei einem vollständigen Verlust der Aktivität kommt es kurz nach der Geburt zu einem transepidermalem Wasserverlust und kurze Zeit später versterben die Patienten („collodian babies“).<sup>ii</sup> Diese Befunde konnten in Tierversuchen mit knock-in Mäusen, bei denen mittels SIMP („single insertion mutagenesis procedure“) menschliche Punktmutationen in das Maus-GC-Gen transferiert wurden, bestätigt werden. Hier fand man einen erhöhten Gehalt von freien und kovalent gebundenen Glucosylceramiden. Dagegen zeigte sich, dass der Anteil von Ceramiden deutlich reduziert war.<sup>iii</sup>

Ebenso führt ein erblicher Defekt von SAP-C zu einer Speicherung des Glucosylceramids und so zu einer Variante der Gaucher'schen Erkrankung mit juveniler Verlaufsform.<sup>iv</sup>

*Tay-Sachs*: Diese gehört zur Gruppe der GM2-Gangliosidosen, hervorgerufen durch intralysosomale Anreicherung von GM2. Verschiedene Faktoren sind am

---

<sup>i</sup> Kolter, T. und Sandhoff, K. (1998), Brain Pathol.

<sup>ii</sup> Liu, Y. et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<sup>iii</sup> Döring, T. et al. (1998), FEBS Lett.

<sup>iv</sup> Christomanou H. et al. (1986), Biol. Chem. Hoppe Seyler

Abbau von GM2 beteiligt: HEXA kodiert die  $\alpha$ -Untereinheit des heterodimeren Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase A ( $\alpha\beta$ ) und der homodimeren  $\beta$ -Hexosaminidase S ( $\alpha\alpha$ ); HEXB ist für die  $\beta$ -Untereinheiten wichtig ( $\beta$ -Hexosaminidase A ( $\alpha\beta$ ) und  $\beta$ -Hexosaminidase B ( $\beta\beta$ )). Außerdem kodiert GM2A den GM2-Aktivator. Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Typen der Krankheit. Bei der Variante B (i.e. Tay-Sachs'sche-Erkrankung) ist die  $\alpha$ -Kette der  $\beta$ -Hexosaminidase A durch einen Defekt des HEXA-Gens betroffen, d.h. die Aktivitäten von Hexosaminidase B ist normal, während Hexosaminidasen A und S gestört sind. In der Variante O (Sandhoff'sche Erkrankung) ist das HEXB-Gen mutiert, und somit sind beide  $\beta$ -Hexoaminidasen A und B, i.e. die  $\beta$ -Kette, geschädigt. Die dritte Variante ist eine GM2-Aktivatordefizienz mit normaler Aktivität der Hexosaminidasen A und B.

*Niemann-Pick:* Auch bei dieser Erkrankung kann man drei Fälle unterscheiden. Die A- und B-Varianten gehen auf einen Defekt der sauren Sphingomyelinase zurück und führen zu einer Speicherung von Sphingomyelin.<sup>i</sup> Im Falle der Niemann-Pick Typ C'schen (NP-C) Erkrankung führt ein Defekt des NPC1- oder NPC2-Gens zur massiven Speicherung von Cholesterol in den Lysosomen. Dieses wird in zytosolischen Vakuolen, die lysosomale Marker enthalten, wie z.B. späte Endosomen und Lysosomen, sowie lamellaren Körperchen, die aus solchen Organellen entstehen, angereichert.<sup>ii</sup> Das NPC1-Gen kodiert für ein integrales Membranprotein, welches wahrscheinlich am Transport des Cholesterols aus diesen endozytotischen Kompartimenten heraus und an dessen weiterem Transport zur Plasmamembran beteiligt ist.<sup>iii</sup> Die Krankheitsverläufe aller drei Typen sind phänotypisch jedoch ähnlich.

*Morbus Landing:* Als Morbus Landing wird eine Krankheitsform der GM1-Gangliosidosen bezeichnet. Ursprünglich 1959 von Norman entdeckt („cherry red spot“), wurde sie 1963 als GM1-Speicherkrankheit identifiziert und erstmalig beschrieben.<sup>iv</sup> Heute unterscheidet man drei Varianten, die sich nur durch das Alter des Auftretens unterscheiden. Bei Patienten, die vor dem dritten Lebensjahr versterben, spricht man vom Typ I der Norman-Landing-Erkrankung.<sup>v</sup> Bei dieser GM1-Gangliosidose wird durch einen genetischen Defekt des GAL-Gens der Abbau

---

<sup>i</sup> Schuchman, E.H. und Desnick, R.J. (2001), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*

<sup>ii</sup> Lange, Y. et al. (2000), *J. Biol. Chem.*

<sup>iii</sup> Patterson, M.C. et al. (2001), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*

<sup>iv</sup> Jatzkewitz, H. und Sandhoff, K. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*

<sup>v</sup> Callahan, J.W. (1999), *Biochim. Biophys. Acta*

von GM1 zu GM2 durch GM1- $\beta$ -Galaktosidase gehemmt. Diese Exoglykosidase spaltet  $\beta$ -glykosidisch gebundene Galaktose von GM1.<sup>i</sup> Durch den Defekt reichert sich die 3-5fache Menge an GM1 in der grauen Substanz (Hirnoberflächengewebe) an, so dass ca. 80% des Gangliosidgehalts aus GM1 bestehen (im Vgl. zu 25% eines gesunden Neugeborenen). Auch in den Eingeweiden, besonders der Leber, findet man eine Erhöhung des Gangliosid GM1-Gehalts, jedoch nicht in dem Ausmaße wie im Gehirn.

---

<sup>i</sup> van der Spoel A. et al. (2000), J. Biol. Chem.

### 3 Zielsetzung und Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Verteilung von Gangliosiden in kultivierten Zellen sein. Dabei wurde ein Hauptaugenmerk darauf gerichtet, wie sich die Lipidnachbarschaft von Gangliosiden im Zuge ihrer Endozytose in kultivierten Zellen verändert.

Dazu bedarf es Gangliosid-Derivate, die Markierungen tragen. An Hand dieser Markierungen können diese Moleküle wiederaufgefunden, verfolgt oder auch deren Umgebung charakterisiert werden. Im Falle von GM1 hat man zwei Möglichkeiten zu derivatisieren. Man kann im Ceramidteil (rot unterlegt) funktionelle (NBD- bzw. TPD-) oder radioaktive Fettsäuren einführen. Oder aber man verändert die Acetylgruppe der NANA (grün unterlegt) durch Einführen einer radioaktiven Markierung bzw. einer funktionellen Gruppe wie Biotin. Natürlich gibt es auch die Möglichkeit einer Kombination der verschiedenen Markierungen.

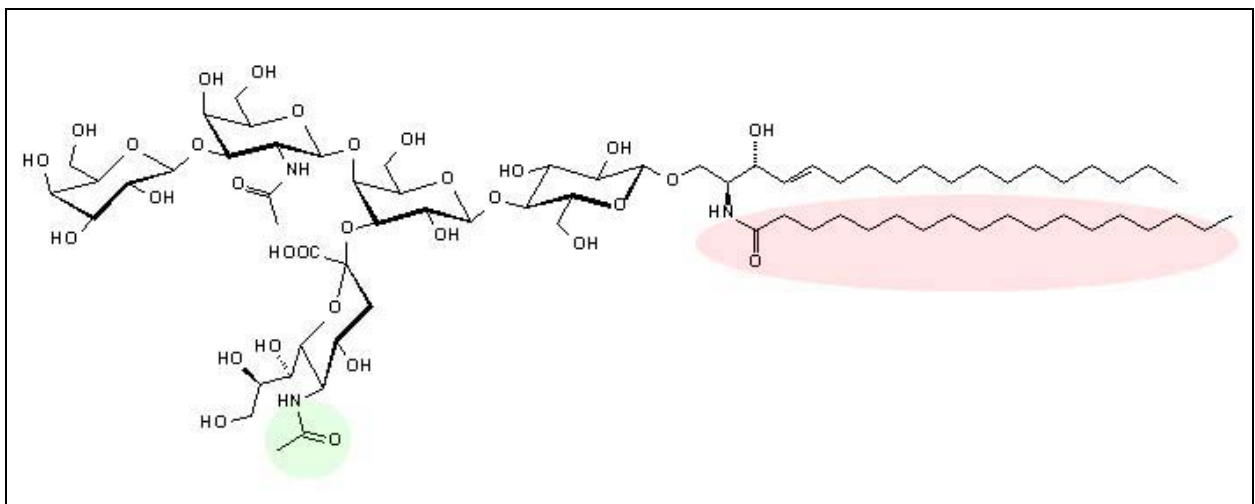


Abbildung 3-1: Markierungsmöglichkeiten von GM1

Als Methode zur Untersuchung der direkt benachbarten Moleküle der Ganglioside wurde die Markierung mit photoaktivierbaren Lipidanaloga gewählt. Durch Einführung einer photoaffinen Gruppe in den Fettsäurerest von GM1 sollten in Belichtungsexperimenten die benachbarten Lipide markiert werden. Die erhaltenen Kopplungsprodukte sollten anschließend mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Durch Versuche in Modellmembranen sollten Referenzen der Kopplungsprodukte erstellt werden und die in den

Zellkulturversuchen erhaltenen Photokopplungsmuster anschließend damit verglichen werden.

Dazu wurden GM1-Derivate mit unterschiedlich langen Acylkettenlängen dargestellt, die eine photolabile Trifluormethylphenyldiaziriny (TPD)-Gruppe trugen. Dadurch war es möglich, die Nachbarschaft dieser Derivate zu untersuchen. In Fortführung der Untersuchungen mit derivatisierten Glucosyl-thio-ceramid- und Sphingomyelinderivaten<sup>i</sup> wurde untersucht, inwieweit die verschiedenen Kettenlängen der photoaktivierbaren Fettsäuren einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lipidumgebung von GM1 hatten und wie sich der Anteil der Photoinsertion in Wasser änderte. Dazu wurde zwei Derivate einer TPD-Fettsäure hergestellt. Zum einen ein längeres TPD-Derivat mit einer C<sub>10</sub>-Acylkette und ein zweites mit einer C<sub>5</sub>-Kette. Diese wurden mit Lyso-GM1 gekoppelt, so dass nach Inkorporation des resultierenden photolabilen GM1 in die Membranen der TPD-Rest in den hydrophoben Bereich gelangt. Je tiefer dieser Rest innerhalb des hydrophoben Kerns der Membran lokalisiert war, um so wahrscheinlicher sollte auch die Markierung der flexiblen Bereiche der Fettsäuren bzw. die Alkylseitenkette des Cholesterol sein. Ein weiterer signifikanter Vorteil des langkettigen 10-TPD-dekansäure-GM1 ist, dass es eine geringe „off-rate“ hat und nicht spontan aus inneren Membranen heraus diffundiert bzw. zwischen benachbarten Membranen austauscht. Somit sollte es im Gegensatz zu den kurz-kettigen Derivaten mit hoher „off-rate“ nicht aus den intralysosomalen Membranen herauswandern.<sup>ii</sup> Da bereits bekannt ist, dass BMP den Abbau lysosomaler Ganglioside (GM1, GM2), Sphingomyelin, Glucosylceramid und Ceramid stimuliert (siehe Kapitel 2.6) und vermutet wird, dass dieses Lipid sich auf intralysosomalen Membranen befindet, sollte es zu einem Kopplungsprodukt zwischen BMP und C<sub>10</sub>-TPD-GM1 führen.

Ein zweiter Ansatz der Membranuntersuchung mit Hilfe von Gangliosidderivaten war die Markierung mittels „optischer“ Label. Darunter fallen zum einen NBD-Derivate, welche unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 475 nm fluoreszieren und so lichtmikroskopisch nachgewiesen werden können. Da diese Methodik keine exakte Lokalisierung zulässt, wurden zusätzlich Biotin-markierte Derivate synthetisiert. Mit Hilfe dieser können elektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschlüsse über die Topologie des lysosomalen Verdaus der GSL liefern. Sie zeigen

---

<sup>i</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

<sup>ii</sup> Schwarzmann, G. (2001), Semin. Cell Dev. Biol.



detaillierte Momentaufnahmen aus der Zelle und somit auch die topologische Verteilung von GSL in den verschiedenen Membranen.<sup>i</sup> Die Visualisierung der GSL mit Hilfe des Elektronenmikroskops geschieht durch die Immuno-Gold-Technik, bei der Konjugate aus Antikörpern und kolloidalen Goldkörnchen verwendet werden. Dieser Antikörper kann sich nun an eine antigene Determinante heften. Hierbei hat sich Biotin bewährt,<sup>ii</sup> das über mehrstufige Synthesen an die Ganglioside geknüpft wird.<sup>iii</sup> Damit der Antibiotin-Antikörper einen besseren Zugang zur Sonde findet, wird diese über einen „Verlängerungsarm“ (Spacer) mit dem Gangliosid verbunden. Alle Derivate (mit Ausnahme der NBD markierten) tragen für eine einfachere Reaktionskontrolle während der Synthese und Quantifizierung der Zwischen- und Endprodukte eine radioaktive Markierung. Ebenso kann durch dieses zweite „Labelling“ auf einfache Weise die Einbaurate des Gangliosids in kultivierten Zellen bestimmt und die Stoffwechselprodukte dünnschichtchromatographisch identifiziert werden.

### 3.1 Synthesen

In den folgenden Kapiteln werden die Synthese verschiedener Markierungsmoleküle (Label) und die Kopplung dieser Moleküle mit GM1 beschrieben. Die Produkte wurden nummeriert. Diese Nummerierung entspricht der in Kapitel 5 (Material und Methoden) benutzten Nummerierung. Dort finden sich auch die Ausbeuten und Charakterisierungen dieser Produkte, auf deren Erwähnung an dieser Stelle verzichtet wurde.

#### 3.1.1 *Synthese der C<sub>5/10</sub>-TPD-Fettsäure und C<sub>5/10</sub>-TPD-GM1-Photosonde*

Anfang der 80er Jahre wurde die Substanzklasse der Trifluormethylaryldiazirine entwickelt.<sup>iv</sup> Diese zeichnen sich durch einige vorteilhafte Eigenschaften aus. So hat das nach Belichtung der photoaktivierbaren Trifluormethylphenyldiaziranyl-Gruppe (TPD-Gruppe) entstehende Carben eine hohe Reaktivität und inseriert in benachbarte Bindungen, auch C-H-Bindungen, innerhalb von Nanosekunden. Dabei

---

<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (1999), J. Histochem. Cytochem.

<sup>ii</sup> Wilchek, M. und Bayer, E. A. (1984), Immunology Today

<sup>iii</sup> Albrecht, B. et al. (1997). Chem. Phys. Lipids

<sup>iv</sup> Brunner, J. et al. (1980), J. Biol. Chem.

ist eine Insertion in O-H-Bindungen deutlich präferiert. Die Kopplung des Carbens führt zu stabilen kovalenten Bindungen, die während Isolierung und Aufreinigung der entstandenen Verbindungen erhalten bleiben. Die Photolyse der Diazirine erfolgt bei einer Wellenlänge von 360 nm. Dieses hat zur Folge, dass die Derivate trotz ihrer Reaktivität bei gedämpftem Tageslicht eine gute Handhabbarkeit der unbelichteten TPD-Verbindungen bieten und auch die Amidbindungen der Proteine und Glykosphingolipide intakt bleiben. Des Weiteren sind sie gegen mittelstarke Säuren und Basen inert.

1986 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe die Synthese einer C<sub>3</sub>-Fettsäure mit einer photolabilen TPD-Gruppe und deren Kupplung an ein tritiiertes Lyso-GM1 beschrieben.<sup>i</sup> Dieses wurde 1997 unter Anlehnung an die dort verwendete Synthesestrategie wieder aufgegriffen und zwei photoaktivierbaren Fettsäuren synthetisiert, welche mit Lyso-Glucosyl-thio-ceramid gekoppelt wurden. Dabei wiesen die Fettsäuren eine Acylkettenlänge von 3, 5 bzw. 7 Kohlenstoffatomen vor der TPD-Gruppe auf.<sup>ii</sup> Dies entspricht in etwa einer „geradlinigen“ Fettsäure von C<sub>9</sub>-, C<sub>11</sub>- bzw. C<sub>13</sub>-Acylketten. Es konnte gezeigt werden, dass auf Grund der thioglykosidischen Bindung die [<sup>14</sup>C]-Glucose-Kopfgruppe nicht durch die lysosomale Glucocerebrosidase abgespalten werden kann, so dass die radioaktive Markierung auch im Zuge der Endozytose erhalten bleibt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die abbauresistenten Glc-S-Cer-Sonden innerhalb der Zellen im Golgi-Apparat postendozytotisch glykosyliert werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Einbau- und Stoffwechselraten mit zunehmender Kettenlänge der Photosonde abnehmen.<sup>iii</sup> Als interessanter Aspekt erwies sich, dass sich diese photolabilen Glc-S-Cer-Sonden 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. Dieser Befund zeigte sich nur in zellulären Membranen, nicht aber in Modellmembranen (Liposomen), wo keine besondere Affinität der Sonden zum Cholesterol nachgewiesen werden konnte.

---

<sup>i</sup> Schummer, D. (1986), Diplomarbeit

<sup>ii</sup> Hörschemeyer, J. (1997), Diplomarbeit

<sup>iii</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

In der vorliegenden Arbeit wurden nun GM1-TPD-Derivate synthetisiert, welche photoaktivierbare Fettsäurereste tragen. Es wurden zwei Acylkettenlängen gewählt, um jeweils einem „kurzkettigen“ und einem „langkettigen“ GM1 zu entsprechen. Dabei ist zu beachten, dass die kurzkettigen Derivate eine weit höhere „off-rate“ (als ihre Homologen mit längerer Fettsäure) besitzen und dadurch zwischen benachbarten Membranen ihren Platz wechseln. Eine transversale Diffusion von einer zur anderen Membranhälfte („flip-flop“) kann jedoch ausgeschlossen werden. Durch ihre Fähigkeit, schnell durch wässrige Phasen zu diffundieren, können sie über BSA:Lipidkomplexe (1:1) kultivierten Zellen angeboten werden. Die „semi-truncated“ GSL (Glykosphingolipide mit einer natürlichen Alkylkette des Sphingoidanteils ( $C_{18}$ - $C_{20}$ ) und einer kürzeren Acylkette mit einer Länge von 6-10 C-Atomen) dissoziieren selbst unter Temperaturblock der Endozytose ( $4^{\circ}\text{C}$ ) aus dem Komplex in die Plasmamembran.<sup>i</sup> Dies ist die Voraussetzung für kinetische Studien, da man einerseits die Derivate inserieren kann, andererseits aber bei dieser Temperatur noch keine Endozytose stattfindet.

Eine längere TPD-Acylkette bedingt, dass die „off-rate“ der Sonden, d.h. ihre Diffusion aus der Membranebene heraus, sinkt.<sup>ii</sup> Es hat sich jedoch gezeigt, dass die langkettigen TPD-Sonden auf Grund 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. Somit können sie also nicht unter Temperaturblock der Endozytose in das äußere Blatt der Plasmamembran inseriert werden und die Beladungszeit, die nötig ist, um eine genügende Menge Gangliosid in die Plasmamembran zu inserieren, steigt um ein Vielfaches. Dafür kann man aber davon ausgehen, dass gerade wegen dieser geringen „off-rate“ die Derivate in die Lysosomen gelangen und dort kumulieren. Vermutlich befinden sie sich dort auf intralysosomalen Vesikeln, so dass nach Endozytose von  $C_{10}$ -TPD-GM1 die Lipidumgebung in intraendosomalen bzw. – lysosomalen Vesikeln untersucht werden kann.

Da endogene Lipide naturgemäß längere Fettsäurereste als die hier synthetisch hergestellten photoaktivierbaren Fettsäuren tragen, ist deren „off-rate“ extrem gering. Daher war es wünschenswert, bei den Photomarkierungen ein den endogenen Substraten entsprechendes langkettiges Lipid zu verwenden.

---

<sup>i</sup> Schwarzmann, G. (2001), *Semin. Cell Dev. Biol.*

<sup>ii</sup> Brown, R.E. et al. (1985), *Chem. Phys. Lipids*

Die Beladung von kultivierten Zellen mit natürlichen Gangliosiden kann direkt exogen über ihre Mizellen erfolgen. Dabei können Moleküle nach Anbindung der Mizellen an die Oberflächenproteine der Extrazellulärschicht der PM in diese inkorporiert werden. Nach Trypsinierung der Zellen verbleiben die Ganglioside als „Trypsin-stabile“ Moleküle in der Membran. Mizellen, die nur locker an der Zelle anhaften, können hingegen durch diese Enzymbehandlung wieder von diesen entfernt werden.<sup>i</sup>

Die Synthese der beiden Fettsäure-Analoga wurde in Anlehnung an die bereits erwähnten Arbeiten durchgeführt.<sup>ii</sup> Als Ausgangsverbindung der 10-stufigen Synthese der C<sub>5</sub>- und C<sub>10</sub>-TPD-Fettsäure dienten die käuflich erhältlichen 5-Phenylpentansäure bzw. 10-Phenyldekansäure. Der Syntheseweg ist für die beiden Kettenlänge identisch.

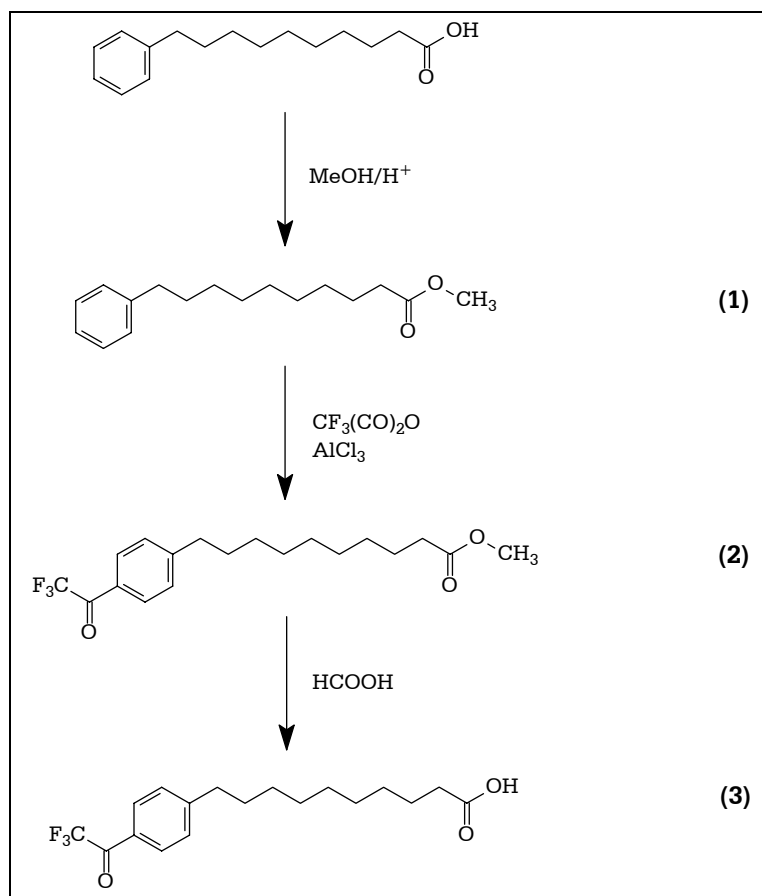
Der erste Schritt in der Synthese ist eine Schützung der freien Säure durch eine Methylgruppe. Nach Friedel-Crafts-Acylierung des Aromaten mit Trifluoressigsäureanhydrid kann der stabile Methylester durch Erhitzen der Verbindung in Ameisensäure zersetzt werden. Der dabei entstehende Ameisensäure-methylester (K<sub>p</sub> 32°C) kann durch entsprechende Temperaturregulierung aus dem Rückflußkühler entweichen und so dem Gleichgewicht entzogen werden. Es folgt eine erneute Einführung einer Schutzgruppe der Carboxylgruppe. Dieser Schritt der Veresterung mit einer tert. Butylgruppe zeigte sich bei langen Fettsäuren als äußerst kompliziert. In Folge der geringen Carbonylaktivität reagieren Carbonsäuren im allgemeinen nur langsam mit Alkoholen, und die Veresterung muss durch Zusatz entsprechender Katalysatoren (Säuren, Ionentauscher, wasserentziehende Verbindungen) forciert werden. Neben der Acidität (Positivierung des Carbonylkohlenstoffatoms), sind die sterischen Verhältnisse der Reaktionspartner ausschlaggebend für den Reaktionsverlauf. Mit steigender Raumfüllung des zu veresternden Alkohols und vor allem des mit der Carboxylgruppe verbundenen Alkylrests sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit. Es gelingt daher allenfalls nur mit sehr geringen Ausbeuten, Ester tertiärer Alkohole durch direkte Veresterung darzustellen. Der Weg über DCC liefert dabei einigermaßen zufriedenstellende Ergebnisse.

---

<sup>i</sup> C allies, R. et al. (1977), Eur. J. Biochem.

<sup>ii</sup> Brunner, J. et al. (1980), J. Biol. Chem. / Schummer, D. (1986), Diplomarbeit

Die p-Trifluoracetylgruppe wurde nun mit Hydroxylamin in das entsprechende Oxim überführt. Die anschließende Tosylierung lieferte eine gute Abgangsgruppe, die eine leichte Zyklisierung unter Druck in flüssigem Ammoniak zum Diaziridin ermöglicht. Das entstandene Produkt wurde nachfolgend durch Oxidation mit frisch gefälltem Silberoxid in das lichtempfindliche Diazirin überführt. Die Abspaltung der tert. Butylgruppe erfolgt leicht durch Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur. Man erhält die freie Säure, welche zum Abschluss für die weitere Kopplung mit Lyso-GM1 zum entsprechenden Succinimidylester aktiviert werden muss.



**Abbildung 3-2:** Syntheschema der TPD-Fettsäure (hier 10-Phenyldekansäure) und ihres Succinimidylesters; die Zahlen entsprechen der Nummerierung der Syntheseprodukte in Kapitel 5

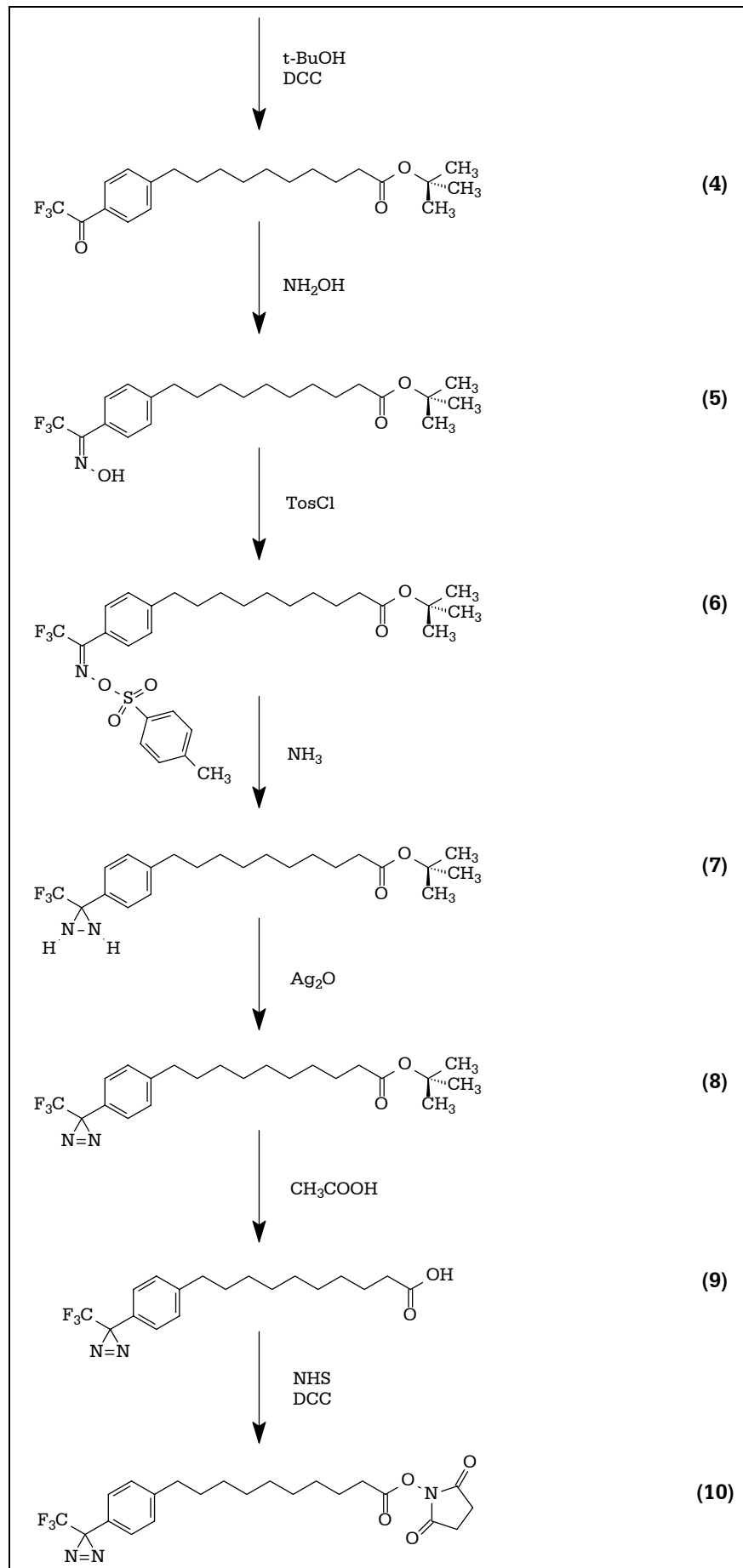


Abbildung 3-2 (Fortsetzung): Syntheschema der TPD-Fettsäure und ihres Succinimidylesters

Zur Kupplung der aktivierten TPD-Fettsäuren mit GM1 muss das Gangliosid vorbereitet werden. Dazu muss die natürliche Fettsäure entfernt werden, was durch alkalische Hydrolyse geschieht.<sup>i</sup> Dadurch werden sowohl die Aminogruppe des Ceramidteils, als auch die der Sialinsäure deacyliert. Die Acetylgruppe am N-Acetylgalaktosaminrest wird auf Grund ihrer elektrostatischen Abschirmung durch die Carboxylatgruppe der N-Acetylneuraminsäure (NANA) nur in geringem Maße gespalten.

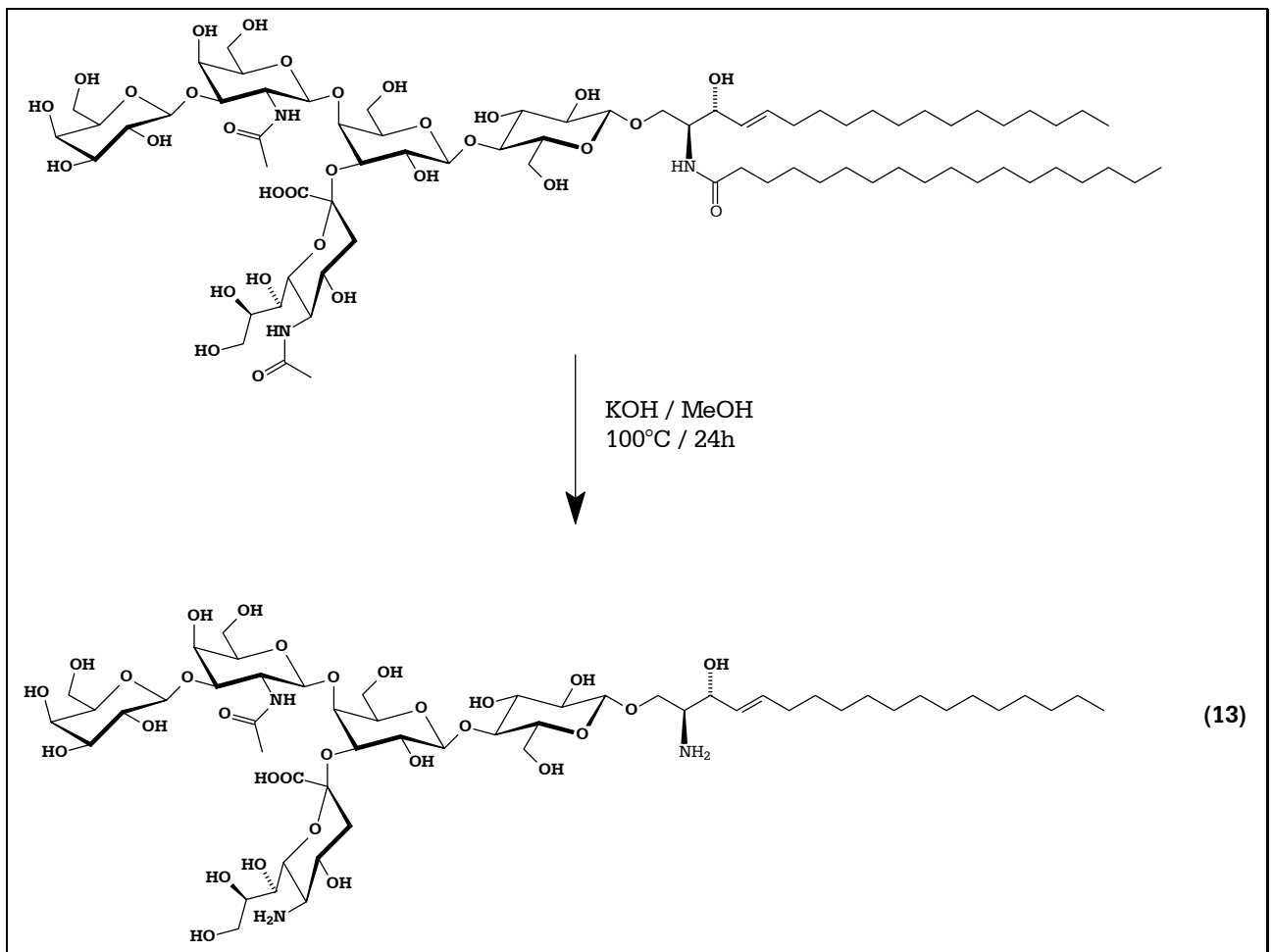


Abbildung 3-3: Deacylierung des natürlichen GM1 zu Monodeacetyl-lyso-GM1 („Total-deac“)

Durch Neutralisation mittels Essigsäure bleiben nach alkalischer Hydrolyse allerdings große Mengen an Natriumacetat im Reaktionsansatz zurück. Vor säulenchromatographischer Reinigung muss dieses Salz abgetrennt werden. Eine

<sup>i</sup> Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1987), *Methods in Enzymology*

direkte Entsalzung über RP18-Säulen ist bei größeren Mengen nicht praktikabel, da bei der alkalischen Hydrolyse vom Ceramidrest Fettsäuren abgespalten werden, die nach dem Ansäuern als freie Säure vorliegen. Diese freien Säuren sind in einem Gemisch aus Wasser und Methanol unlöslich und können die Reinigung über RP18 behindern. Auch die Aufreinigung über Dialyse ist auf Grund großer Ausbeuteverluste nicht sinnvoll. Daher wurde folgende Methode angewendet.<sup>i</sup> Zuerst werden durch Extraktion mit Hexan die entstandenen Fettsäuren entfernt. Man kann nun leicht die methanolische Phase mit den Gangliosiden abtrennen. Durch erneutes Waschen der Hexanphase mit Wasser werden eventuelle Reste von Monodeacetyl-Lyso-GM1 extrahiert. Bei mehrmaliger Extraktion kann hierbei mit nahezu quantitativen Ausbeuten gearbeitet werden. Nach Vereinigung und Einengen im Stickstoffstrom können nun die immer noch vorhandenen Salze durch bekannte Methoden über RP18 leicht abgetrennt werden. Für spätere Reaktionen muss man beachten, dass keine Amine und kein Ammoniak mehr vorhanden sein dürfen, da die aktivierten Säuren sofort mit freien Aminogruppen zu einem unreaktiven Amid reagieren würden. Deswegen wurden Amine und Ammoniak aus ihren Salzen durch das schwerflüchtige tertiäre Amin N-Ethyl-diisopropylamin („Hünigbase“) verdrängt und im Stickstoffgegenstrom entfernt.

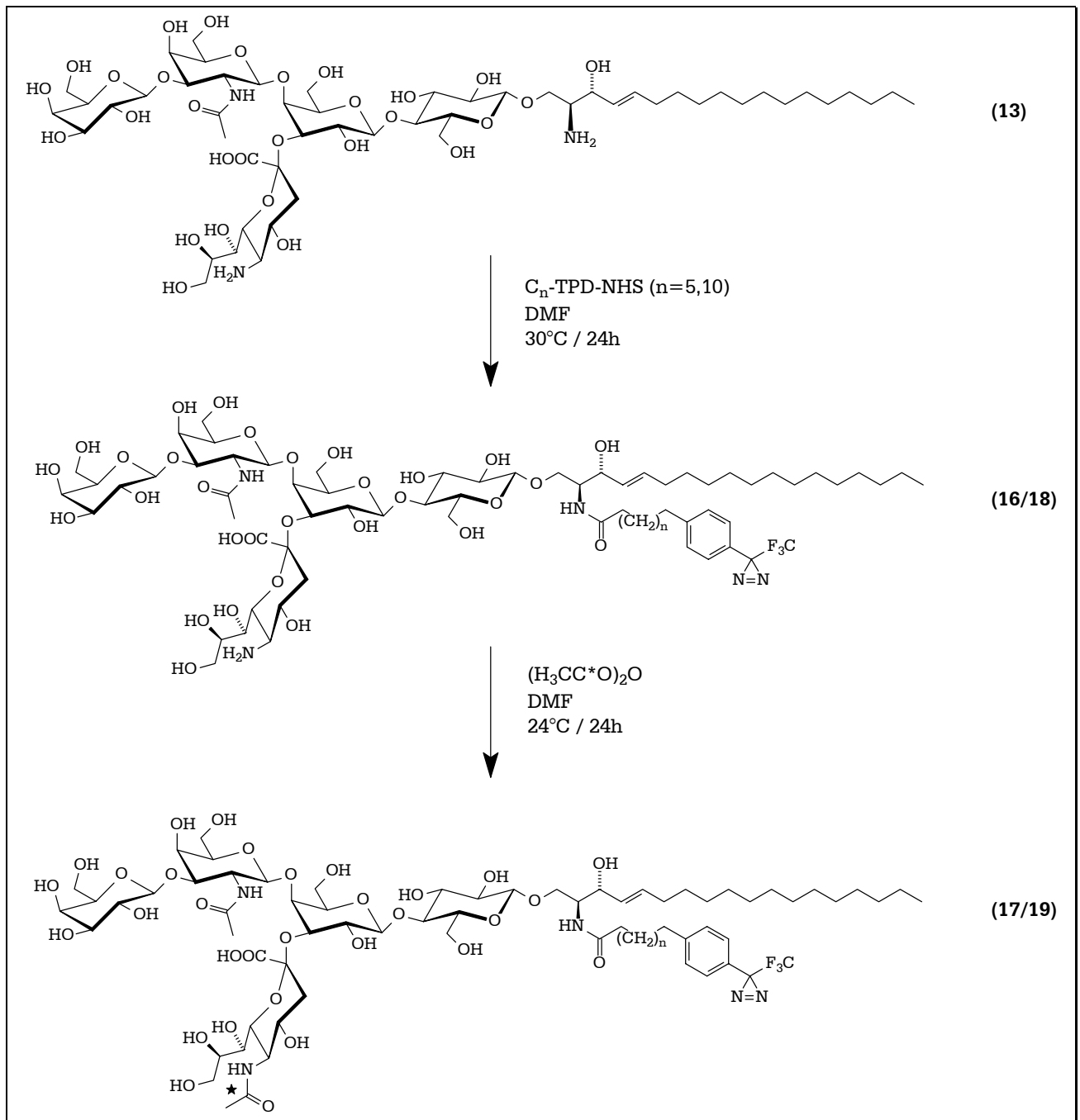
Die beiden entstandenen freien Aminogruppen unterscheiden sich in ihrer Reaktivität. Dieses macht man sich im Folgeschritt zu Nutze. Die am Sphingosinrest lokalisierte Aminogruppe hat sich in bisherigen Reaktionen als reaktiver erwiesen als diejenige am Neuraminyrestes. Als erstes kann die Einführung der aktivierten TPD-Fettsäure auf einfachem Wege in DMF durch Zusammengeben der beiden Reaktionspartner (TPD-Sonde und Deacetyl-lyso-GM1) erfolgen. Man bekommt nahezu quantitativ Monodeacetyl-(5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)-pentansäure)-GM1 bzw. das entsprechende Dekansäurederivat.

Durch nachfolgende Umsetzung der Aminogruppe des N-Acetylneuraminsäurerests mit am C-1 radioaktiv markiertem Acetanhydrid erhält man die gewünschte Doppelmarkierung. Einerseits befindet sich im Ceramidanker eine photoaktive TPD-Gruppe und zum anderen nun eine radioaktive Markierung in der N-Acetyl-Gruppe der NANA.

---

<sup>i</sup> von Coburg, A. (1998), Diplomarbeit





**Abbildung 3-4:** Synthese der  $C_{5/10}$ -TPD-acyl-GM1-Sonde; der Stern (\*) indiziert die  $^{14}C$ -Markierung. Produkte 16 und 17 sind die kurz-kettigen  $C_5$ -TPD-GM1 ( $n=2$ ) und Produkte 18 und 19 diejenigen der lang-kettigen Photosonde  $C_{10}$ -TPD-GM1 ( $n=7$ )

### 3.1.2 Synthese der biotinylierten GM1-Derivate

Die Synthese der Biotin-markierten Ganglioside startet mit der Synthese der Biotinsonde. Diese Biotinsonde wird über einen Verlängerungsarm an den Neuraminsäurerest im Oligosaccharidteil des Gangliosids geknüpft. Der Verlängerungsarm besteht aus einer C<sub>4</sub>-Kette ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), deren C1-Kohlenstoffatom radioaktiv ist, so dass auch in diesen Derivaten zwei Markierungen im Molekül vorhanden sind.

Ausgehend von Biotin-N-succinimidylester erfolgt die Reaktion mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) spontan in DMF. Anschließend muss für die spätere Kupplung der Sonde mit einer Aminofunktion des GM1 die Carboxylatgruppe wieder aktiviert werden. Nach Aktivierung mit DCC führt die Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid zum aktivierten Ester.

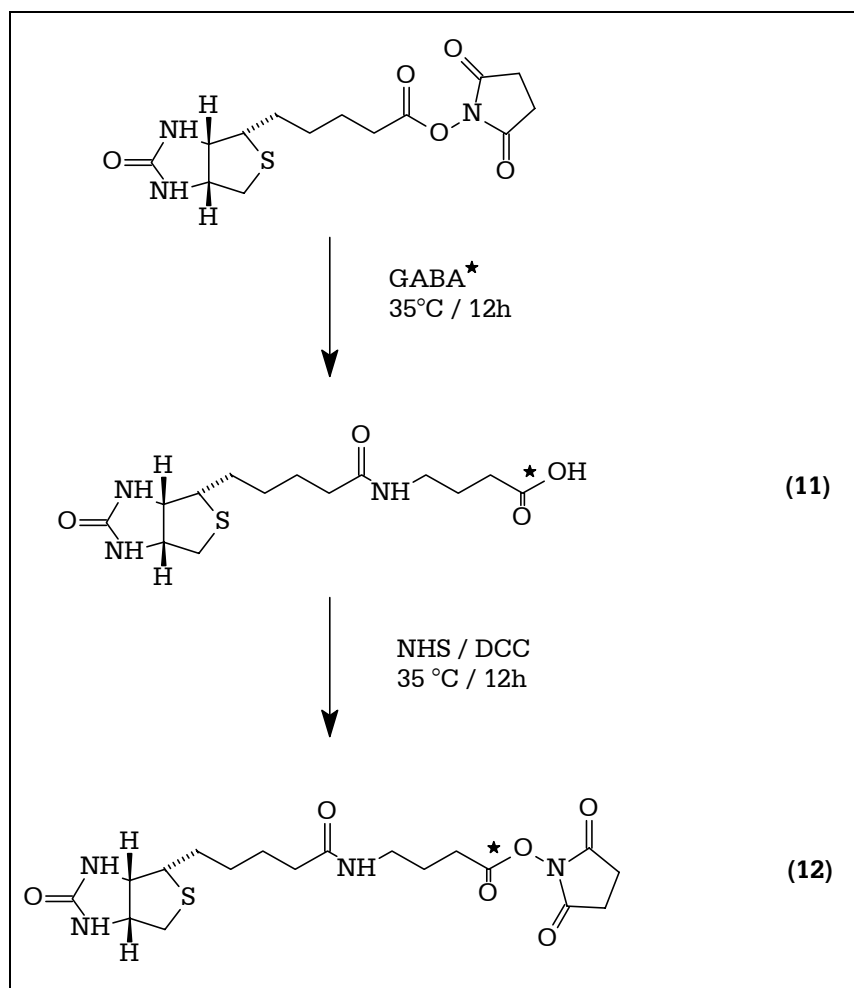
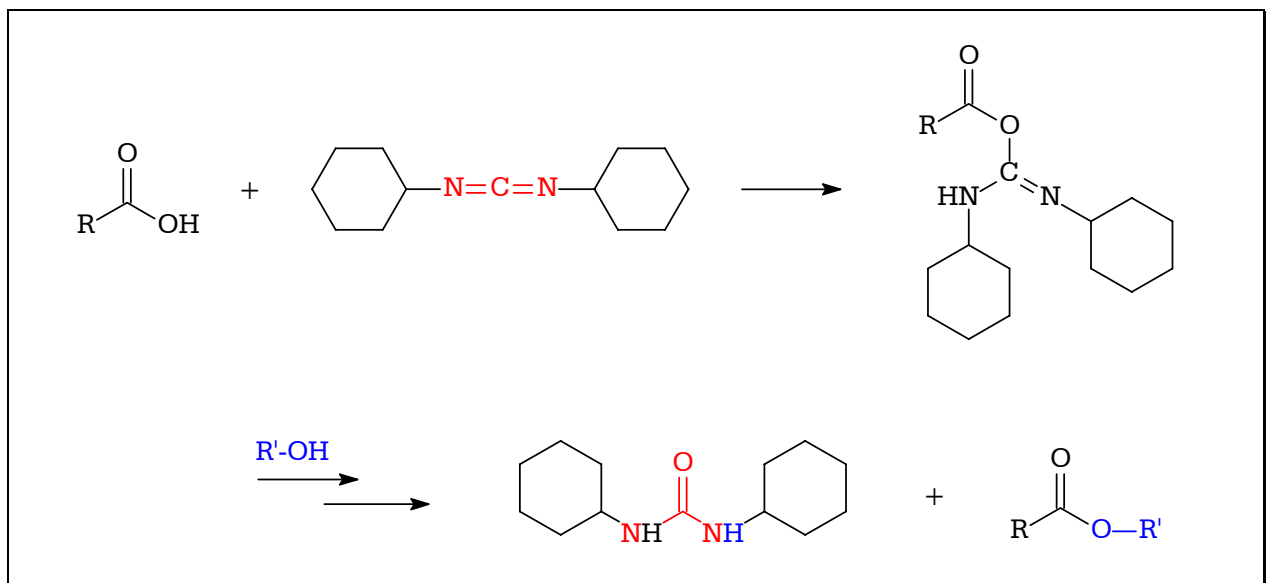


Abbildung 3-5: Synthese der aktivierten Biotinsonde (Biotin-[1-<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-Säure-N-succinimidylester)

Da die Schutzgruppen säuren- und basenlabil sind, muss die Veresterung unter sehr milden Bedingungen mit Hilfe eines wasserentziehendem Mittels erfolgen. Auch hier kann man auf Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zurückgreifen, welches sich schon in der Peptidchemie und Synthese der Photosonde bewährt hat. DCC lagert sich in einer elektrophilen Addition an die Carboxylgruppe der Säure an. Entsprechend einem Anhydrid kann nun über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus das eigentliche Aktivierungsreagenz eingefügt werden. Der entstehende Harnstoff ist in allen gängigen Lösungsmitteln schwerlöslich und sehr reaktionsträge. Weil der Harnstoff der Reaktion entzogen wird, verschiebt sich das Gleichgewicht zur Richtung des gewünschten Succinimidylesters.



**Abbildung 3-6:** Aktivierung einer organischen Säure mit DCC. Gezeigt ist das erste Zwischenprodukt und die Endprodukte Dicyclohexylharnstoff und der aktivierte Säureester.

Im Gegensatz zur Synthese der photoreaktiven GM1-Derivate muss bei den biotinylierten auf Grund der erwähnten Reaktivitätsunterschiede der beiden freien Aminogruppen zuerst die Fettsäure in den Ceramidteil des Deacetyl-lyso-GM1 („Total-deac“) eingeführt werden und anschließend erst die Markierung. Dabei hat man die freie Wahl der Länge der Acylkette, so dass auch hier lang- und kurzkettige Derivate synthetisiert werden konnten. Auch hier erfolgt die Kupplung zwischen Säure und GM1 über den Succinimidylester der freien Säure.

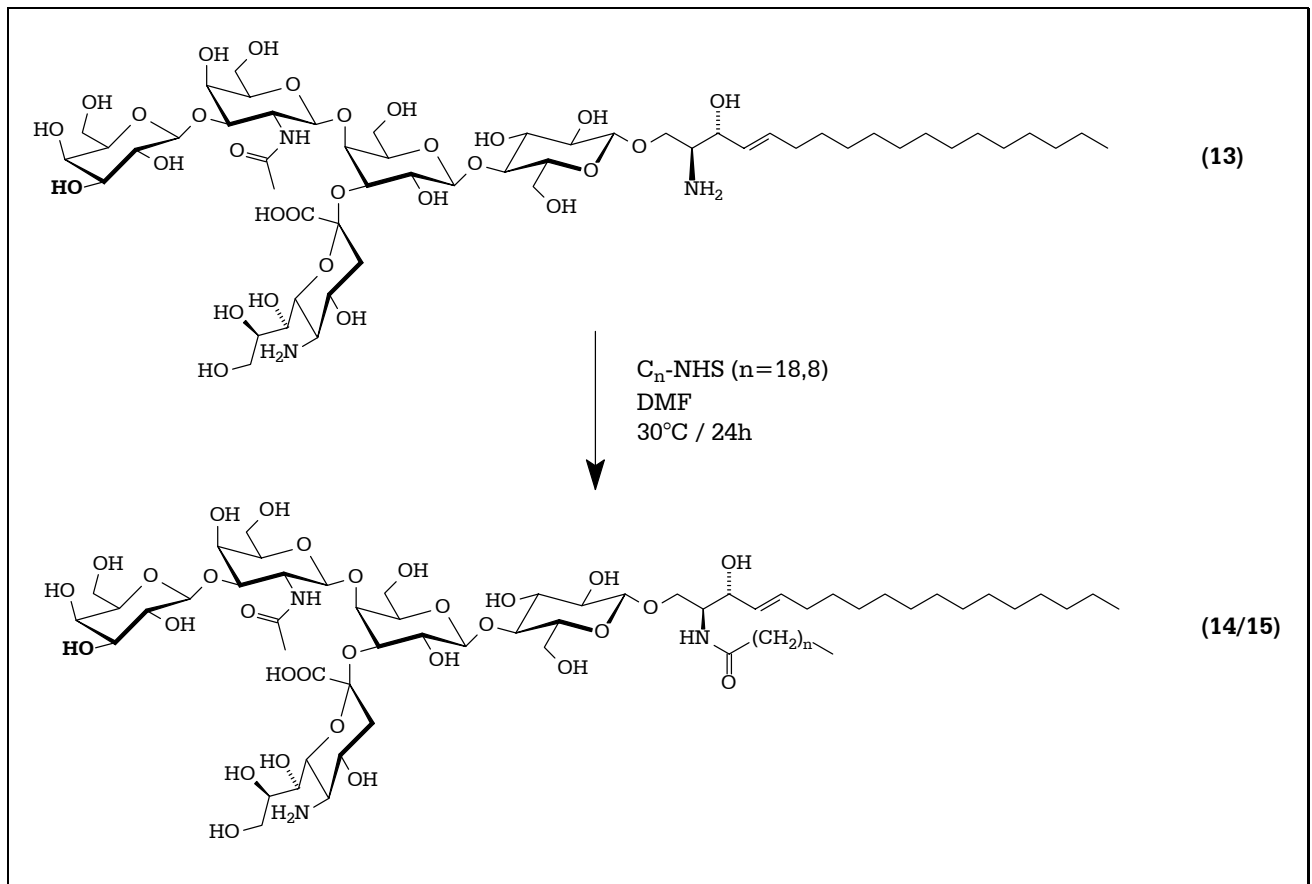


Abbildung 3-7: Kupplung einer aktivierten Fettsäure mit Monodeacetyl-lyso-GM1 („Total-deac“).

Im Anschluss kann nun die Biotinsonde an den Sialinsäurerest geknüpft werden. Bei den kurzkettigen Derivaten kann es dabei zu ungenügenden Syntheseausbeuten kommen. Um die Umsetzung voranzutreiben, kann deswegen auf das hier nicht beschriebene p-Nitrophenol als Aktivierungsreagenz ausgewichen werden.<sup>i</sup> Dazu wird das Monodeacetyl-N-acyl-Derivat in reinem DMF gelöst und mit einer stöchiometrischen Menge an Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-Säure-p-nitrophenylester umgesetzt.<sup>ii</sup> Die Umsetzung des langkettigen GM1-Derivates führt auch mit Aktivierung durch N-Hydroxysuccinimid zu zufriedenstellenden Ausbeuten von Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1.

<sup>i</sup> Galpin I. J. et al. (1979), Tetrahedron

<sup>ii</sup> von Coburg, A. (1998), Diplomarbeit

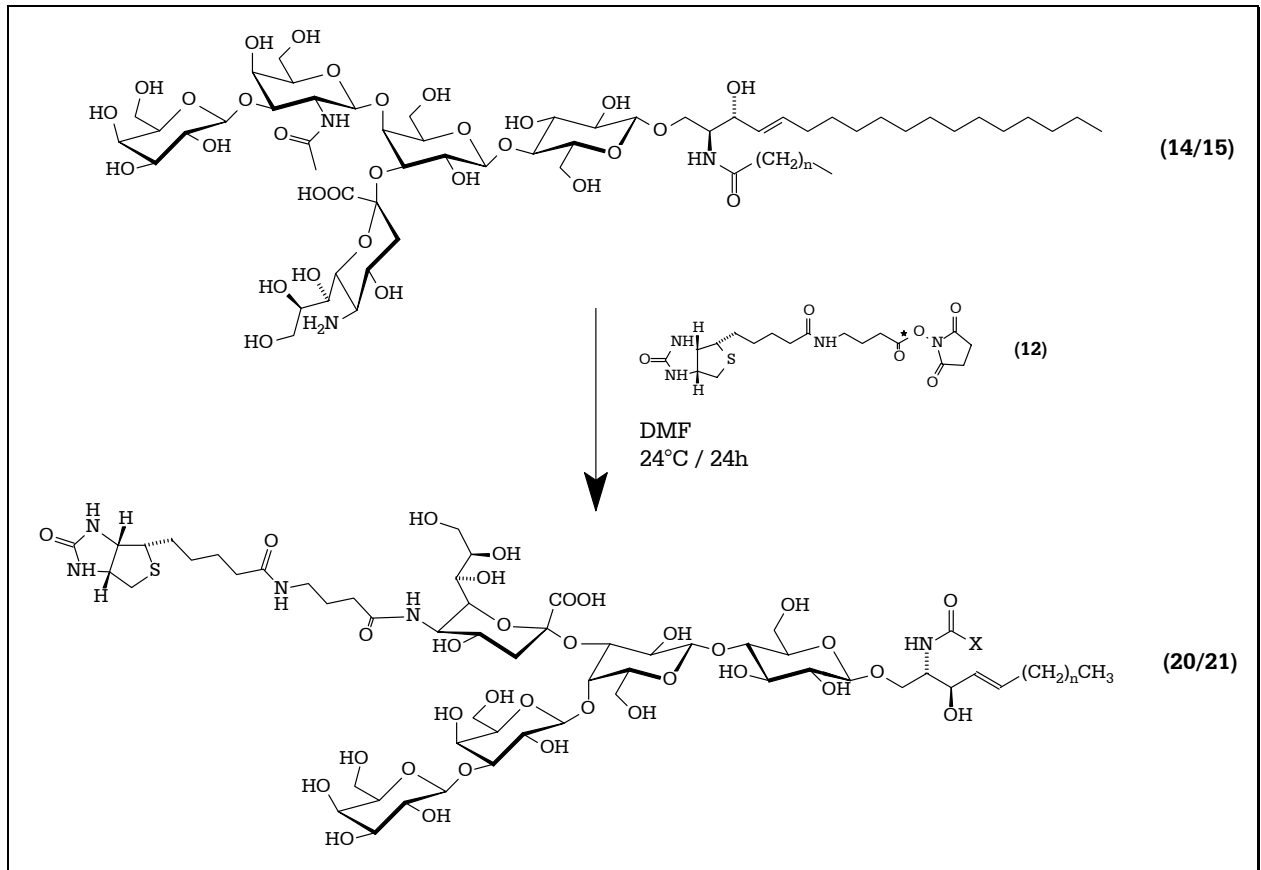


Abbildung 3-8: Kupplung der Biotinsonde mit den Monodeacetylderivaten. Produkt 20 stellt das Derivat der Umsetzung mit Stearinsäure dar ( $X = (\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ) und Produkt 21 folgt aus der Umsetzung mit Oktansäure ( $X = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ).

Damit stehen zwei zweifach markierte GM1-Derivate für elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Verfügung.

### 3.1.3 Synthese der NBD-GM1-Derivate

Für erste Studien sollten GM1-Derivate synthetisiert werden, die auf einfachem Wege schnell Aufschlüsse über Lokalisation von derivatisierten Gangliosiden in Zellen liefern. In unserer Arbeitsgruppe lieferten bereits 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Ceramide (NBD-Cer) gute Ergebnisse zur Darstellung endozytierter Glykolipide.<sup>i</sup> Die Kupplung dieses Labels mit GM1 sollte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops schnell zeigen, ob derivatisiertes GM1 unter Endozytoseblock in die Plasmamembran inserieren und bei Inkubation bei 37°C in die Zelle endozytiert wird.

<sup>i</sup> Albrecht, B. (1991), Diplomarbeit

Da das fertige Label bereits vorhanden war, konnte die Synthese sich auf die Kupplung mit der NBD-Sonde mit Monodeacetyl-lyso-GM1 und anschließender Umsetzung mit Acetanhydrid (siehe Kap. 3.1.1 – Synthese photoaktiver GM1-Derivate) beschränken.

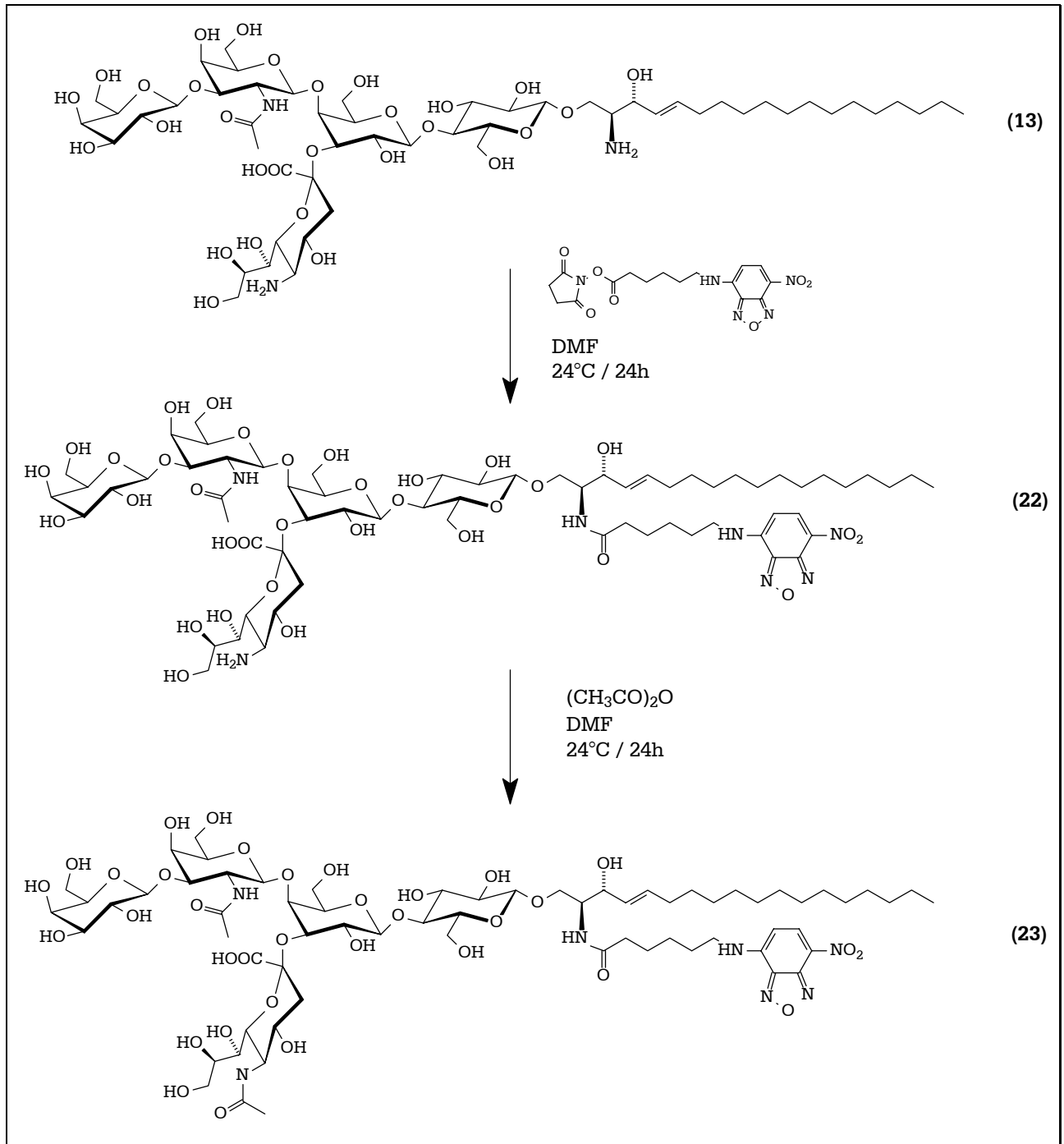


Abbildung 3-9: Kupplung eines NBD-Labels mit Monodeacetyl-lyso-GM1

Da unter Temperaturblock der Endozytose gearbeitet werden sollte, wurde ein kurzkettiges C<sub>6</sub>-NBD-Derivat gewählt, was einem kurzkettigen C<sub>8</sub>-Acyl-GM1 entspricht.

### 3.2 NBD-Insertions Experimente

Für die Einbau- und Stoffwechseluntersuchungen wurden die humanen Fibroblasten auf je drei Objektträger in Zellkulturschalen herangezogen. Das NBD-GM1-Derivat wurde den so kultivierten Fibroblasten exogen als stöchiometrischer 1:1-Lipid/BSA-Komplex angeboten. Bei den ersten Experimenten wurden die Zellen mit den Sonden unter Temperaturblock der Endozytose 90 Minuten bei 4°C beladen, wodurch eine für die weiteren Bearbeitungsschritte ausreichende Menge der Sonden in die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran inkorporiert werden konnte. Dabei ist die Menge der in die Plasmamembran inkorporierten Moleküle von der Temperatur und der Dauer der Inkubation abhängig. Zwischen Inkorporation in die Membran und Adsorption an BSA besteht ein Gleichgewicht, welches sich naturgemäß bei niedrigeren Temperaturen langsamer einstellt. Damit können auch weniger Moleküle in die Plasmamembran inkorporiert werden. Außerdem nimmt bei geringeren Temperaturen die Stabilität des Lipid/BSA-Komplexes zu, so dass sich die Sonden schwerer vom Protein lösen, was ebenfalls eine Senkung der Insertionsrate bedeutet. Jedoch findet bei Temperaturen kleiner 7°C kein vesikulärer Transport innerhalb der Zelle statt, so dass 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.

Da in dieser Versuchsreihe jedoch nur gezeigt werden sollte, dass die Derivate in die Zellmembran inserieren und später in die Zelle aufgenommen werden, spielen Schwankungen in der Insertionsrate nur eine untergeordnete Rolle. Außerdem ist die Darstellung per Fluoreszenzmikroskop nicht so detailliert, dass diese Unterschiede sichtbar sein sollten, solange sie sich in gewissen Grenzen befinden.

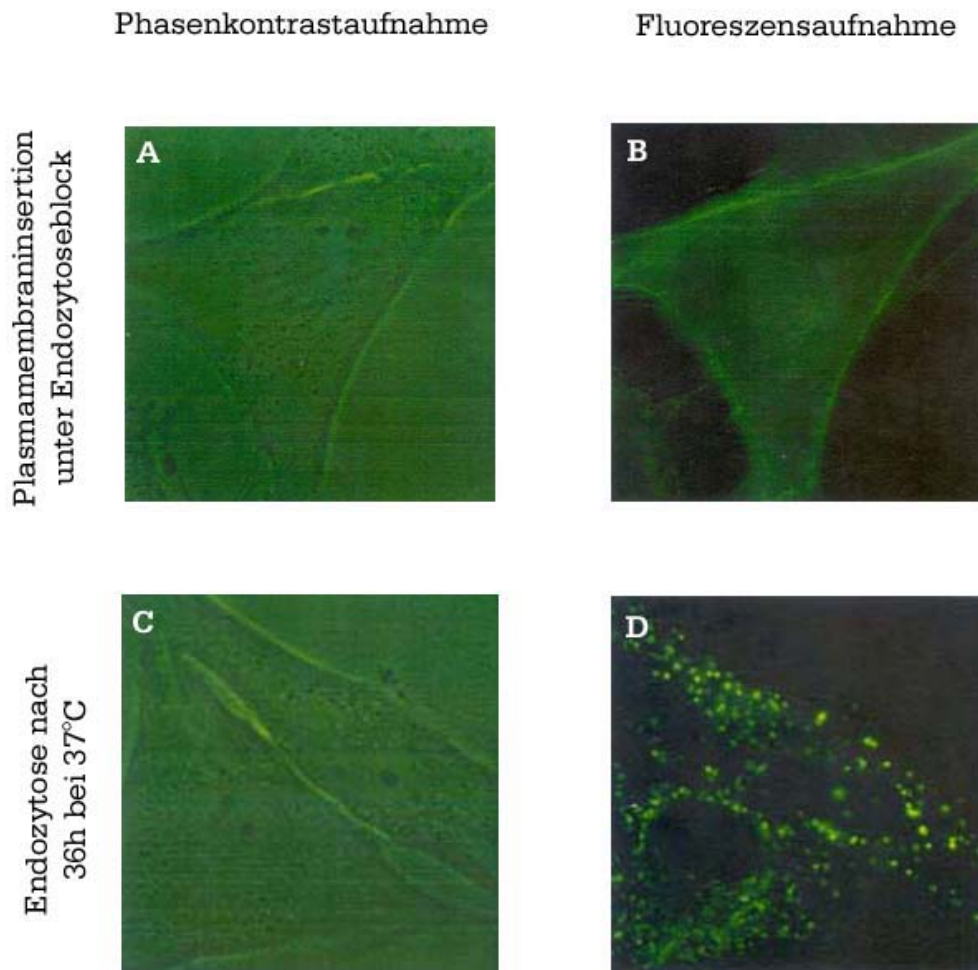
Nach Beladen der Zellen wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit HMEM-Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 475 nm fluoreszieren die GM1-Derivate grün.

In Abbildung 3-10 Bild-(B) erkennt man deutlich, dass das GM1-Derivat in die Plasmamembran inseriert wurde. Im Zellinneren ist jedoch keine Fluoreszenz zu erkennen.

Zur Untersuchung der Endozytose dieser Gangliosidderivate wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt. Die Zellen wurden wie im vorigen Experiment 90 Minuten bei 4°C beladen, aber anschließend, nach Waschen mit HMEM, für 36h bei



37°C im Brutschrank inkubiert. Dies sollte zeigen, dass die Derivate aus der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. In Bild-(D) der Abbildung 3-10 kann man gut erkennen, wie sich die Moleküle in der Zelle verteilt haben. In der Plasmamembran sieht man kaum noch Fluoreszenz, wogegen Moleküle in Zellorganellen grün fluoreszieren.



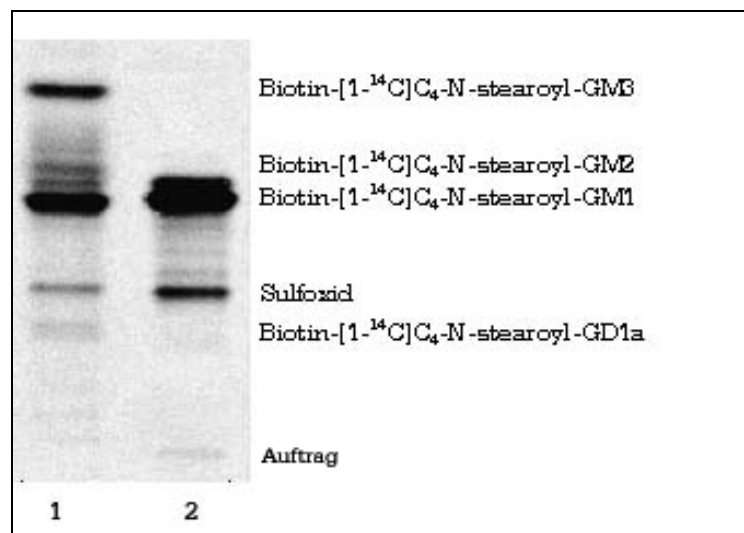
**Abbildung 3-10:** Aufnahmen von Fibroblasten nach Beladung mit NBD-C<sub>6</sub>-GM1. Links dargestellt (A und C) sind Phasenkontrastaufnahmen. Rechts (B und D) die identischen Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht. A und B sind Zellen welche bei 4°C beladen wurden. C und D wurden ebenfalls bei 4°C beladen, anschließend jedoch für 36h bei 37°C inkubiert.

Dies bestätigt frühere „spin-labelling“ Experimente<sup>i</sup> in denen gezeigt wurde, dass derivatisierte Ganglioside in die Plasmamembran inseriert werden können und von dort endozytiert werden.

<sup>i</sup> Schwarzmann, G. et al. (1983), Biochemistry

### 3.3 Zellversuche mit biotinylierten GM1-Derivaten

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass bei bakteriellen Sialidasen durch die Substitution des N-Acetylrestes durch einen N-Butyrylrest in Sialokonjugaten diese resistent gegen bakterielle Sialidasen wurden.<sup>i</sup> In früheren Versuchen konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dieses auch für biotinylierte GM1-Derivate gilt. In dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Lipidextrakte aus Fütterungsexperimenten mit Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 und Biotin-C<sub>4</sub>-[<sup>14</sup>C]C<sub>18</sub>-GM1 an Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass beide Derivate nur bis zu ihren GM3-Derivaten abgebaut werden.<sup>ii</sup> Dies bestätigt frühere Befunde mit biotinyliertem GM1.<sup>iii</sup>



**Abbildung 3-11:** Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Lipidextrakte aus Fütterungsexperimenten mit Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 an humanen Fibroblasten normaler Probanden. Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 37 °C. Die Extraktion und Reinigung der Lipide erfolgte nach den in Kapitel 5 beschriebenen Methoden.

Bahn 1: Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 - Extrakt aus humanen Fibroblasten normaler Probanden  
 Bahn 2: Standard = Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1

Laufmittel: Chloroform/Methanol/15 mM CaCl<sub>2</sub> – 60:35:8 (v/v/v)

Abbildung 3-11 zeigt, dass Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 nur bis zum GM3-Derivat abgebaut wird. Weitergehende Abbauprodukte, wie LacCer, GlcCer und/oder Ceramid waren nicht zu finden. Es zeigt sich jedoch auch, dass trotz langer

<sup>i</sup> Meindl, P. und Tuppy, H. (1966), Mh. Chem.

<sup>ii</sup> von Coburg, A. (1998), Diplomarbeit

<sup>iii</sup> Albrecht, B. (1997), Chem. Phys. Lipids

Inkubationszeit nur wenig GM1 verstoffwechselt wird, wie aus der Quantifizierung der einzelnen Banden deutlich wird (Tabelle 3).

<b>Abbauprodukte von Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1</b>		
<b>(in % von Gesamtradioaktivität pro Bahn)</b>		
	<b>Bahn 1</b>	<b>Bahn 2</b>
Biotin-[ <sup>14</sup> C]C <sub>4</sub> -C <sub>18</sub> -GD1a	2	-
Sulfoxid	5	20
Biotin-[ <sup>14</sup> C]C <sub>4</sub> -C <sub>18</sub> -GM1	49	78
Biotin-[ <sup>14</sup> C]C <sub>4</sub> -C <sub>18</sub> -GM2	12	-
Biotin-[ <sup>14</sup> C]C <sub>4</sub> -C <sub>18</sub> -GM3	29	-

Tabelle 3: Quantifizierung der Abbauprodukte von Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 in humanen Fibroblasten normaler Probanden

Dadurch, dass die betreffenden Biotin-GM3-Derivate in Lysosomen kaum abgebaut werden, ist eine wichtige Voraussetzung für nachfolgende morphologische Untersuchungen erfüllt. Die biotinylierten Derivate können in die Plasmamembran inseriert werden und gelangen von dort aus in abbauende Organellen. Hier werden sie jedoch durch die Derivatisierung mit der Biotinsonde nur partiell abgebaut und reichern sich in Lysosomen an. Sie bleiben somit in ihren Grundeigenschaften ein Gangliosid, und sind in elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Membranen detektierbar.

Zur elektronenmikroskopischen Lokalisation musste als erstes durch Bestimmung der Einbaurrate festgestellt werden, ob genügend Moleküle des GM1-Derivats für einen elektronenmikroskopischen Nachweis in Zellen eingebaut worden waren. Die Zellen wurden jeweils mit einer 10<sup>-5</sup> M Lösung aus 20 nmol Biotin-[<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 in 2 ml eines Mediums aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 0,3% fötalem Kälberserum (FKS) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung geerntet. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet erneut mit PBS-Lösung gewaschen und in Wasser suspendiert. Aus dieser Suspension wurde durch Szintillationszählung eines Aliquots die Radioaktivitätsmenge bestimmt. Eine Proteinbestimmung wurde

sowohl nach der Methoden von Bradford als auch durch BCA-Bestimmung durchgeführt.

<b>Einbauraten (in nmol Lipid / mg Protein) von biotinylierten GM1 in kultivierten Zellen im Vergleich</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>
Stearoyl-GM1-Derivat	<b>5,2 ± 0,5</b>	<b>12,7 ± 0,7</b>

**Tabelle 3-1:** Einbaurate von Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 in humanen Fibroblasten normaler Probanden (A) und CHO-Zellen („chinese hamster ovary cells“) (B)

Die Zellen wurden jeweils mit einer 10<sup>-5</sup> M Lösung aus 20 nmol Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 in 2 ml eines Mediums aus DMEM und 0,3% fötalem Kälberserum (FKS) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung geerntet. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet erneut mit PBS-Lösung gewaschen und in Wasser suspendiert. Aus dieser Suspension wurde durch Szintillationszählung eines Aliquots die Radioaktivitätsmenge bestimmt. Eine Proteinbestimmung wurde sowohl nach der Methoden von Bradford, als auch durch BCA-Bestimmung durchgeführt.

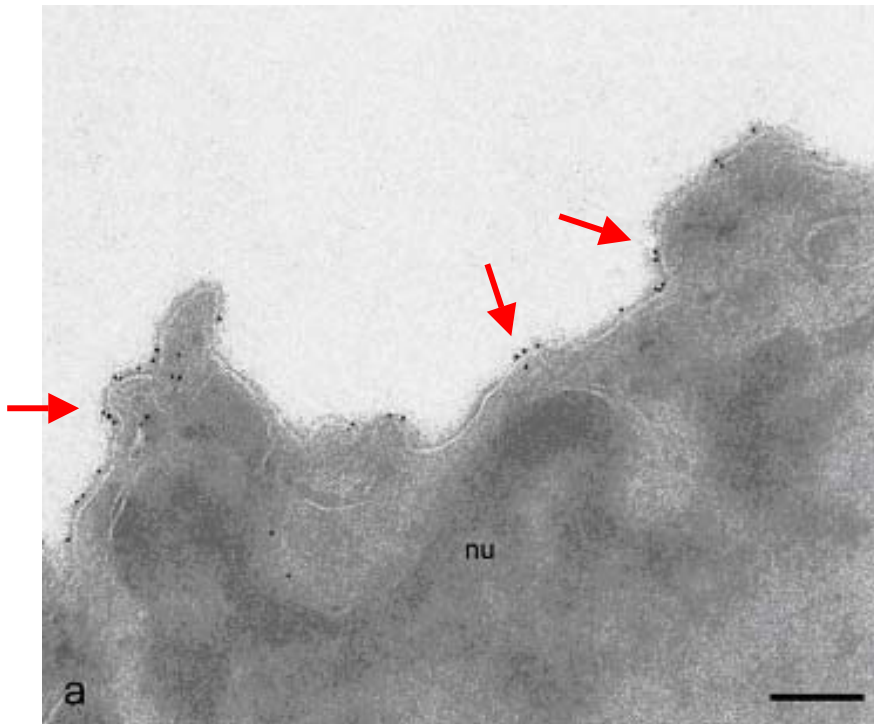
Spalte A: Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1; menschliche Fibroblasten normaler Probanden  
 Spalte B: Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1; chinese hamster ovary cells

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden lediglich humane Fibroblasten normaler Probanden benutzt. Wenn man von der realistischen Schätzung von 10<sup>6</sup> Zellen pro mg Protein ausgeht, wären das bei einer Einbaurate 5,2 nmol/mg Protein ca. 3\*10<sup>9</sup> Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 Moleküle pro Zelle. Dies ist ausreichend für eine elektronenmikroskopische Detektion.

Für die Aufnahmen der endozytierten Ganglioside wurden konfluente Fibroblasten 72 h mit einer 10 µM Lösung von Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 bei 37 °C in DMEM mit 0,3 % FKS inkubiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Lokalisierung des markierten Gangliosids mit Hilfe von Gold-gekoppelten Antibiotin-Antikörpern.<sup>i</sup> Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass Biotin-[<sup>14</sup>C]<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 durch goldgekoppelte Antibiotin-Antikörper auf Gefrierschnitten spezifisch nachgewiesen werden konnte. Eine Lipiddelokalierung hat hierbei offensichtlich nicht stattgefunden, da die Antikörper jeweils mit Membranen assoziiert sind und nicht frei im Zytosol schwimmen. Die Abbildung 3-12 zeigt eine

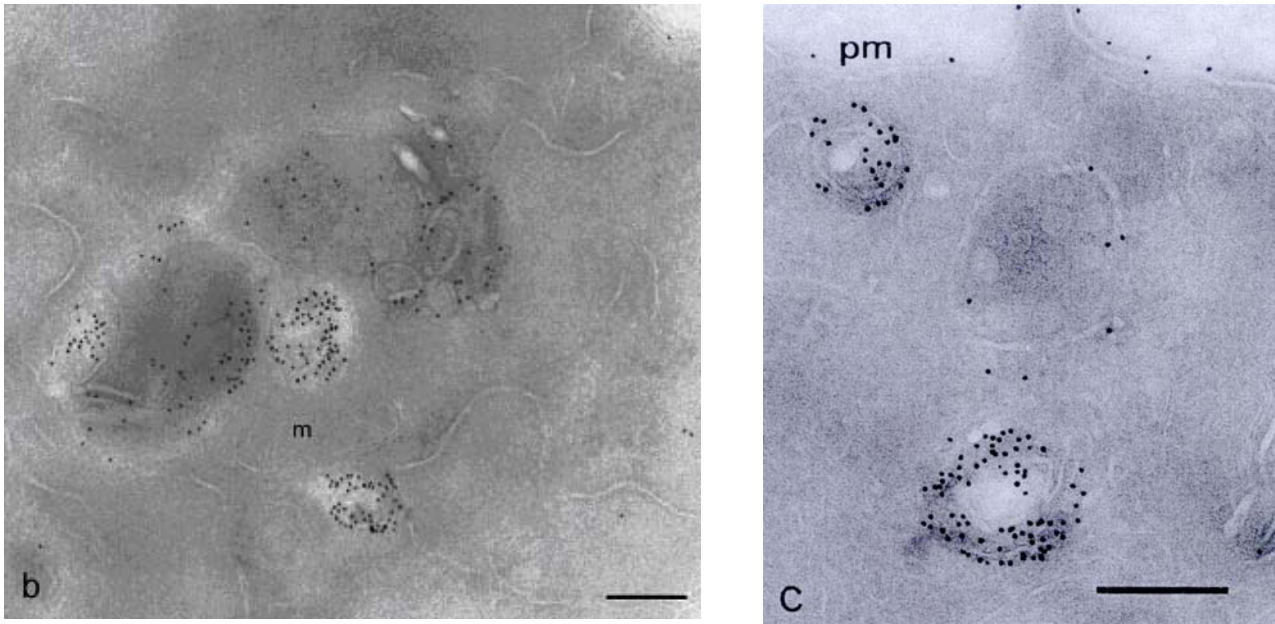
<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (1999), J. Histochem. Cytochem.

elektronenmikroskopische Darstellung der Plasmamembran humaner Fibroblasten nach Beladung und Inkubation mit Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1.



**Abbildung 3-12:** Elektronenmikroskopische Darstellung von Zellen mittels Gefriertechnik. Als schwarze Punkte sind über Antikörper gebundene Goldpartikel (10 nm) zu erkennen, die an biotinylierte GM1 gebunden hatten. Das Bild zeigt die Lokalisierung in der Plasmamembran. Der schwarze Balken hat eine Länge von 200 nm.  
nu = Zellkern

Man erkennt die Goldkörnchen, welche in die Plasmamembran inserierte GM1-Moleküle repräsentieren. Dabei zeigt sich, dass Biotin-GM1 nicht statistisch über die Plasmamembran verteilt ist, sondern in klar definierten Bereichen lokalisiert ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass exogenes GM1 und somit auch andere exogene Ganglioside in Plasmamembranen inserieren und später in spezifische Regionen segregieren.



**Abbildung 3-13:** Immunolabelling von Gelfrierschnitten: Humane Fibroblasten wurden 72 h mit einer 10  $\mu\text{M}$  Lösung von Biotin-[ $^{14}\text{C}$ ]C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>-GM1 bei 37 °C wie beschrieben inkubiert. Die Gelfrierschnitte wurden mit an Gold (10nm) gekoppelte Anti-Biotin-Antikörper markiert.<sup>i</sup> Das Bild B zeigt Biotin-GM1 in multilamellaren Körperchen und auf inneren Membranen endozytischer Organellen in Bild C. Der schwarze Balken entspricht 200 nm.

pm = Plasmamembran

m = Mitochondrien

Das GM1-Derivat konnte auch auf Membranstrukturen im Inneren endozytischer Organellen nachgewiesen werden. Diese Lokalisierung entspricht den Ergebnissen, in denen mit Hilfe von Cholera-toxin die intrazelluläre Lokalisierung von GM1 untersucht wurden.<sup>ii</sup> Da langkettige GM1-Derivate in wässriger Lösung Mizellen bilden und lediglich durch Langzeit-Inkubation in ausreichender Menge in Zellen eingebaut werden können, ist es nicht auszuschließen, dass die Zellen intakte Mizellen über „fluidphase“ Endozytose aufgenommen haben. Daher kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ob die in Zellorganellen detektierten Biotin-Gangliosid-Moleküle membranständig sind oder zu einem gewissen Anteil mizellare Moleküle repräsentieren.

<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (1999), J. Histochem. Cytochem.

<sup>ii</sup> Parton, R. G. (1994), J. Histochem. Cytochem

### 3.4 Photoaktive GM1-Derivate (TPD-GM1)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass derivatisierte Glykosphingolipide in Zellmembranen inserieren und auch endozytiert werden, sollte im nächsten Schritt die Lipidumgebung dieser GSL untersucht werden. Zumal aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Hinweise erhalten wurden, dass GM1-Derivate in Mikrodomänen segregieren.

Mit Hilfe von photoaktiven GM1-Derivaten sollte die direkte Umgebung von GM1, sowohl in der Plasmamembran, als auch seine Lipidnachbarschaft im Zuge der Endozytose in kultivierten Zellen untersucht werden. Eine Möglichkeit der Untersuchung der den Glykosphingolipiden direkt benachbarten Moleküle, ist die Markierung mit photolabilen Lipidanaloga, die bei Belichtung eine reaktive Spezies generieren. Derivatisiert man GM1 mit einer photoreaktiven Acylkette (TPD), so bildet diese nach Belichtung ein hoch reaktives Carben.

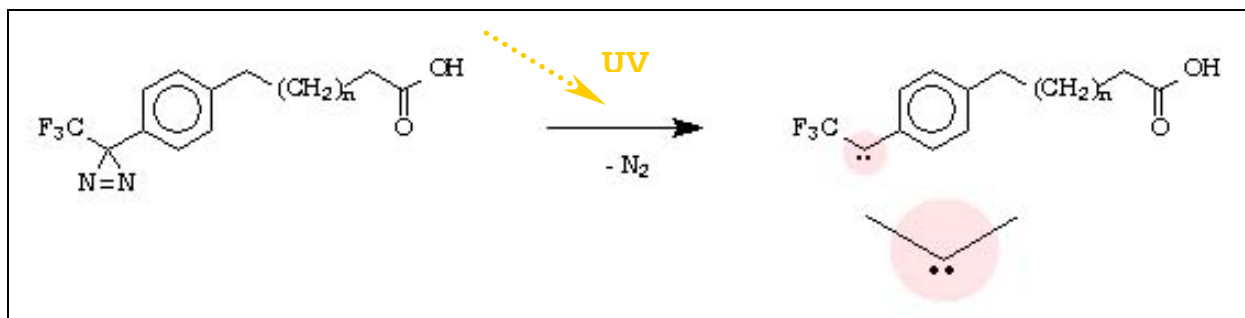


Abbildung 3—14: Carbenerzeugung nach Bestrahlung mit UV-Licht

Das entstandene Carben reagiert nun schnell mit einem seiner Nachbarmoleküle. Dieses kann entweder ein Lipid, Protein, Wasser oder auch ein anderes TPD-GM1 sein. An welche Stelle das Carben bindet, ist zwar im geringen Maße abhängig von der Länge der Acylkette, ansonsten aber im Grossen und Ganzen statistisch.

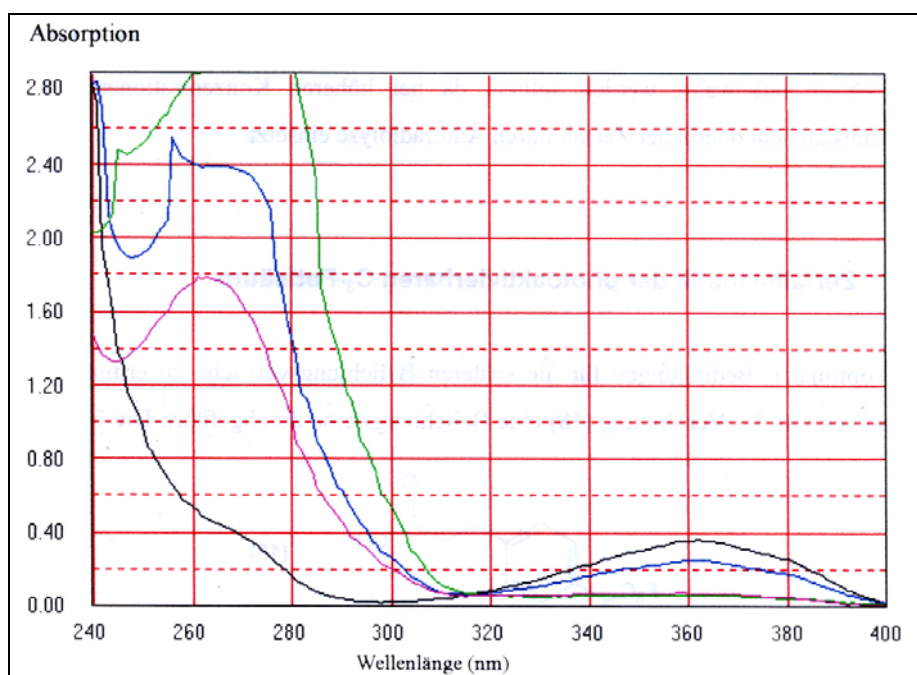
Abhängig von der Domäne, in die das Gangliosidderivat segregiert ist, können jedoch bestimmte Kopplungsprodukte gehäuft auftreten. So wurde gezeigt, dass in der Plasmamembran die Photoinsertion mit Cholesterol das Hauptprodukt darstellt.<sup>1</sup> Auch die Art der umgebenden Membran spielt eine wichtige Rolle. So ändert sich im Zuge der Endozytose der prozentuale Anteil der gefundenen Kopplungsprodukte (Cholesterol, PC und SM) mit TPD-GM1.

<sup>1</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

Die erhaltenen Kopplungsprodukte konnten anschließend mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert werden.

### 3.4.1 Charakteristika der TPD-Derivate

Damit zuverlässige Ergebnisse erhalten werden, bedarf es einiger Ansprüche an die photoaktiven Sonden. So sollten sie in kürzester Zeit zum Carben zerfallen und ebenso schnell mit dem Nachbarmolekül reagieren. Dass die TPD-Fettsäuren dieses erfüllen, sei hier nochmals aufgegriffen. Um die geeigneten Bedingungen für die Belichtung der Derivate festzulegen, wurden Testreihen mit 3-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyl)phenyl)propansäure durchgeführt. Dazu wurde eine 1mM Lösung in Methanol für verschiedene Zeiten belichtet und die Extinktion gemessen.<sup>1</sup>



**Abbildung 3-15:** Zerfallskinetik einer 1mM Lösung C<sub>3</sub>-TPD in Methanol. Die verschiedenen Kurven zeigen die verschiedenen Zeitintervalle. Schwarz = ohne Belichtung, blau = 1 sec, grün = 2 sec und rot = 5 sec.

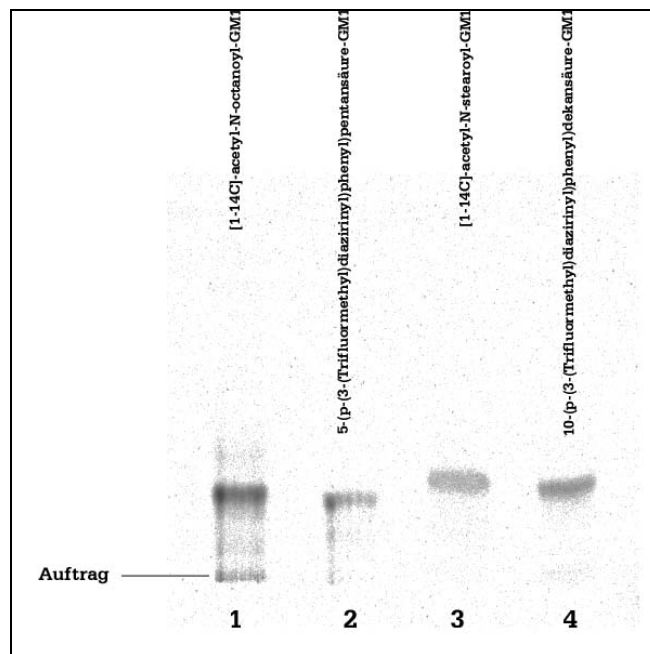
Das erste Absorptionsmaximum um ca. 270 nm kommt aus der Ringöffnung der Diazirin-Funktion zum umgelagerten Diazoisomer zustande. Auffällig ist hierbei, dass nach längerer Belichtung diese Bande wieder abnimmt, was auf die Abspaltung

<sup>1</sup> Hörschemeyer, J. (1997), Diplomarbeit



molekularen Stickstoffs zurück zuführen ist. Bei 362 nm sieht man das Absorptionsmaximum der Diazirin-Gruppe. Nach lediglich 2 Sekunden Belichtung erreicht dieses bereits sein Minimum und verändert sich nicht weiter. Um die Proben schonend zu behandeln ist es notwendig die Belichtung, auf Grund der erheblichen Wärmeentwicklung der Belichtungsapparatur auf Eis durchzuführen. Auch hier gereicht die kurze Belichtungszeit zum Vorteil.

Weiterhin sollten die derivatisierten Ganglioside ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen, wie ihre natürlichen Pendanten. Neben der Tatsache, dass sich derivatisierte Ganglioside in Plasmamembranen inserieren und in der Zelle verstoffwechselt werden, kann man auf einfachem Wege zeigen, dass sie sich auch physikalisch ähnlich verhalten. Dazu wurden jeweils ein langkettiges und ein kurzkettiges underivatisiertes GM1 neben dem entsprechenden TPD-GM1 dünnschichtchromatographisch untersucht. Man kann davon ausgehen, dass sich bei physikochemisch ähnlichem Verhalten auch die  $R_f$ -Werte entsprechen. Die folgende Abbildung 3-16 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-N-octanoyl-GM1 und  $\text{C}_5$ -TPD-GM1, sowie [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-N-stearoyl-GM1 und  $\text{C}_{10}$ -TPD-GM1.



**Abbildung 3-16:** Vergleich des Laufverhaltens von kurzkettigen und langkettigen GM1 und seinen TPD-Derivaten.

Bahn 1: [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-N-octanoyl-GM1

Bahn 2:  $\text{C}_5$ -TPD-GM1

Bahn 3: [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-N-stearoyl-GM1

Bahn 4:  $\text{C}_{10}$ -TPD-GM1

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $\text{CaCl}_2$ /100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v)

Bahn 1 und 2 zeigen die radioaktiv markierten Derivate kurzkettiger GM1-Analoga. Die anderen beiden Bahnen ( 3 und 4) stellen langkettige GM1 dar. Man sieht, dass das „semi-truncated“ C<sub>8</sub>-GM1 (1) in seinem Laufverhalten dem C<sub>5</sub>- TPD-GM1 (2) ähnelt. Beide weisen in einem Laufmittel von Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl (v,v,v,v 50:50:4:8) einen R<sub>f</sub>-Wert von  $0,195 \pm 0,05$  (die Fehlergrenze resultiert aus der Dicke der Banden und die daraus entstehenden Messungenauigkeiten) auf. Im gleichen Laufmittel entsprechen sich natürliches GM1 (3) und C<sub>10</sub>- TPD-GM1 (4). Hier findet man einen R<sub>f</sub>-Wert von  $0,22 \pm 0,01$ .

### **3.4.2 Liposomenexperimente mit photoaktiven GM1-Derivaten**

Um Aussagen über die später erhaltenen Kopplungsprodukte treffen zu können, bedarf es Vergleichsmöglichkeiten. 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).

Die Analysen der Insertionsprodukte erfolgte hierbei mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC) und für eine zweifelsfreie Charakterisierung der Photokopplungsprodukte durch zusätzliche massenspektrometrische Analyse.

Durch die Verwendung eines *LiposoFast*-Filtersystems konnten unilamellare Liposomen dargestellt werden.<sup>i</sup> Dabei wurde in Wasser statt in Pufferlösung gearbeitet, um nach Belichtung der Liposomenlösungen die anschließende Gefriertrocknung zu erleichtern. Auch die Charakterisierung der Photokopplungsprodukte über HPTLC-Dünnschichtplatten wird dadurch vereinfacht, da keine die Laufeigenschaften beeinflussenden Salze anwesend sind.

---

<sup>i</sup> MacDonald, R.C. et al. (1991), *Biochim. Biophys. Acta*

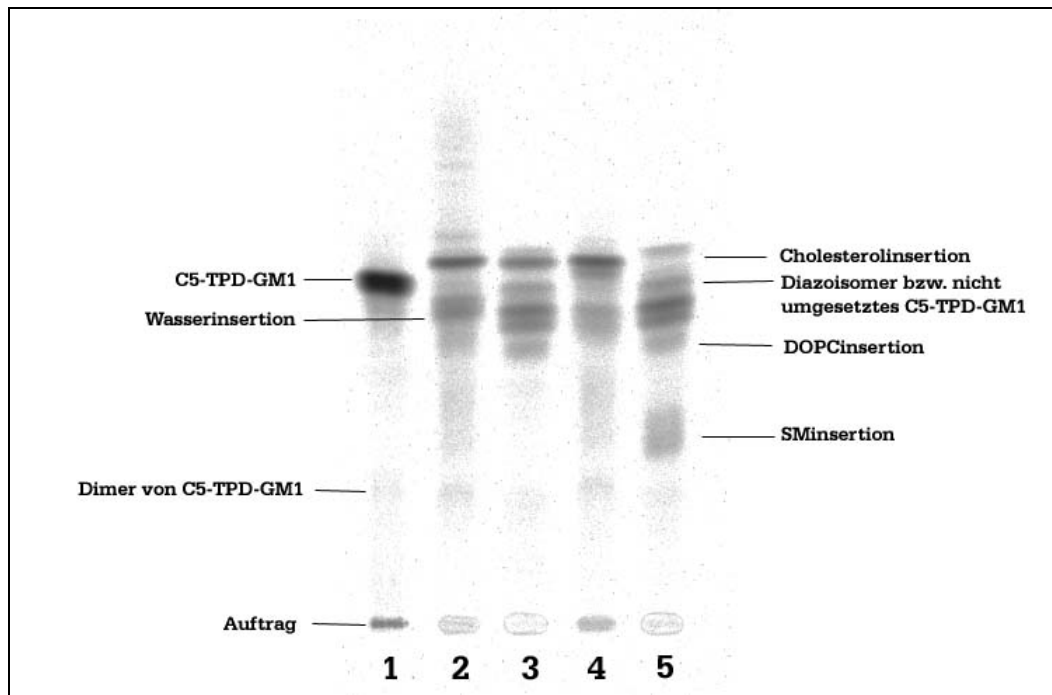
### 3.4.2.1 Untersuchungen zu Photokopplungsprodukten von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 (N-5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1) in Modellmembranen

In der folgenden Abbildung 3-17 ist ein Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Photosonde mit verschiedenen Wirtlipiden in Liposomen dargestellt. In den Bahnen 2 bis 5 sind die photogekoppelten Produkte aufgetragen. Bahn 1 zeigt die unbelichtete Photosonde. Die Kopplungsprodukte von Bahn 2 bis 4 sind Vergleichsliposomen von Mischungen aus DOPC und Cholesterol. Dabei wurde in Bahn 4 Kopplungsprodukte (entsprechend der Bahn 3) nach alkalischer Hydrolyse aufgetragen. In der letzten Bahn wurden Liposomen aus drei verschiedenen Lipiden aufgetragen (Cholesterol, DOPC und SM). Tabelle 3-2 gibt die prozentuale Zusammensetzung der Liposomen in Spalte A an. Eingesetzt wurden jeweils 1000 nmol Gesamtlipidmenge. In Spalte B ist der prozentuale Anteil an Photoinsertionsprodukten der Sonden nach Belichtung aufgeführt

	Cholesterol		DOPC		SM		Sonde	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Bahn 1</b>	-	-	-	-	-	-	100	-
<b>Bahn 2</b>	40	<b>46,3±1,7</b>	58	<b>52,7±2,6</b>	-	-	2	-
<b>Bahn 3</b>	30	<b>35,8±1,5</b>	68	<b>64,2±3,1</b>	-	-	2	-
<b>Bahn 4</b>	30	n.d.*	68	n.d.	-	-	2	-
<b>Bahn 5</b>	30	<b>35,9±1,4</b>	38	<b>34,6±1,5</b>	30	<b>29,5±1,2</b>	2	-

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Vergleichliposomen für verschiedene Lipide mit 5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentansäure-GM1 (in mol %)

\* da es sich hierbei um die alkalische Hydrolyse der Kopplungsprodukte aus Bahn 3 handelt, ist es nicht sinnvoll hier eine quantitative Bestimmung anzugeben. Zu sehen ist das Kopplungsprodukt der Cholesterolinsertion, jedoch müssten ebenfalls die abgespaltenen Fettsäuren aus dem DOPC-Anteil zu finden sein.



**Abbildung 3-17:** Vergleichsliposomen aus C<sub>5</sub>-TPD-GM1 mit DOPC, Cholesterol und Sphingomyelin

Bahn 1: Standard = C<sub>5</sub>-TPD-GM1 unbelichtet

Bahn 2: DOPC/Cholesterol/Sonde - 58:40:2 (mol %)

Bahn 3: DOPC/Cholesterol/Sonde - 68:30:2 (mol %)

Bahn 4: DOPC/Cholesterol/Sonde - 68:30:2 (mol %) + alkalische Hydrolyse

Bahn 5: DOPC/Cholesterol/Sphingomyelin/Lipid – 38:30:30:2 (mol %)

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser – 50:50:10 (v/v/v)

Man sieht, dass in diesen Referenzliposomen nahezu eine Gleichverteilung der Kopplungsprodukte zu finden ist. Weiterhin ist eine Bande erkennbar, die dem Diazoisomer zuzuordnen ist (oder nicht umgesetztes C<sub>5</sub>-TPD-GM1, was bei den Versuchsbedingungen jedoch unwahrscheinlich ist), welches durch Ringöffnung des Diazirin-Dreirings entsteht. Außerdem ist die Kopplung mit Wasser deutlich als Doppelbande erkennbar, welche auch gleichzeitig das Hauptkopplungsprodukt ist. Diese Doppelbande ist durch Diastereomerenbildung des Kopplungsproduktes zu erklären. Häufig lässt sich aber auf Grund geringer Laufunterschiede auch nur eine Bande auf dem DC erkennen. Das Phänomen der Isomerenbildung findet man vor allem bei Cholesterolkopplungsprodukten und wird später ausführlicher erklärt.

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.

Für die Berechnung der prozentualen Zusammensetzung nach Belichtung (Tabelle 2 – Spalte B) 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 Wirtlipiden repräsentierten. Bei einer statistischen Kopplung 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 teilweise Schwankungen in den Verhältnissen der Lipidinsertion kommen kann. Trotz dieser Schwankungen kann man von einer statistischen Verteilung ohne jegliche Präferenzen sprechen. In Bahn 2-5 sieht man ein Kopplungsprodukt von Photosonde mit Cholesterol oberhalb der Bande des unbelichteten TPD-GM1. Bei höherem Cholesterolgehalt (Bahn 2 = 40 %) findet man oberhalb dieser Cholesterolbande weitere Banden, die vermutlich auf Stereoisomere des Kopplungsproduktes zurück zu führen sind. Bahn 4 zeigt Liposomenextrakt, der in seiner Zusammensetzung Bahn 3 entspricht, nach alkalischer Hydrolyse. Durch diese Behandlung werden Lipide mit Esterbindungen gespalten. Man erkennt, dass die Bande der Insertion der Sonde in DOPC verschwindet und dafür eine neue Bande leicht unterhalb der Cholesterolbande zu sehen ist. Dieses sind die Addukte freigesetzter Fettsäuren mit der C<sub>5</sub>-TPD-Sonde.

#### **3.4.2.2 Erstellung einer Referenzbibliothek der Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 (N-10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekanoyl-lysoGM1) und verschiedenen Lipiden in Modellmembranen**

Entsprechende Referenzen wurden für das langkettige C<sub>10</sub>-TPD-GM1 angelegt. Die Zusammensetzung der verwendeten Liposomen sowie die Auswertung dieser Versuche sind in den Tabellen 3-3a-f dargestellt. Auch hier wurde in Spalte B für die Berechnung der Zusammensetzung nach Belichtung das Produkt der Wasserinsertion und das Diazoisomer der Sonde nicht berücksichtigt.

In der ersten Versuchsreihe wurden zuerst unterschiedliche Konzentrationen von Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) und Cholesterol für Referenzliposomen untersucht. Dabei wurde die Konzentration von Cholesterol in 10%-Intervallen gesteigert (Abbildung 3-18 - Bahn 3-6). Man erkennt, dass die Bildung der Kopplungsprodukte der Sonde mit dem Wirtlipid rein stöchiometrisch erfolgte. In weiteren (hier nicht aufgeführten) Versuchen mit Cholesterol und DOPC in Liposomen zeigte sich, dass

innerhalb einer Fehlerbreite von  $\pm 15\%$  die Photokopplung mit den Wirtlipiden stöchiometrisch erfolgte; es wurde also kein Wirtlipid bevorzugt.

Deutlich zu erkennen sind eine Reihe von Banden (Bahn 3-6) mit hohem  $R_f$ -Wert oberhalb der diskreten Cholesterolbande von Bahn 7. Diese Banden stellen Stereoisomere des Kopplungsprodukte der Cholesterolinserktion dar. Sie entstehen auf Grund der hohen Beweglichkeit der Photosonden senkrecht zur Ebene der Lipidschicht („hopping-rate“). Damit 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 auch in die Seitenkette erfolgen. Dies führt zu unterschiedlichen Polaritäten des neu entstandenen Moleküls. Die Positionsisomere haben auf den Dünnschichtplatten unter Umständen ein unterschiedliches Laufverhalten und können somit in mehrere Banden auftrennen. Auch kann die unterschiedliche Angriffsrichtung des Carbens im Moment der Photokopplung zu Enantiomerenpaaren führen. Dieser Befund bestätigt frühere Befunde mit Glc-S-Cer- und Sphingomyelin-Photosonden, bei denen vor allem die längerkettige C7-Glc-S-Cer-Sonde bei den Insertionsprodukten zwei oder mehrere Banden zeigten, die durch Positionsisomerie bzw. Diastereomerenbildung zu erklären sind.<sup>1</sup>

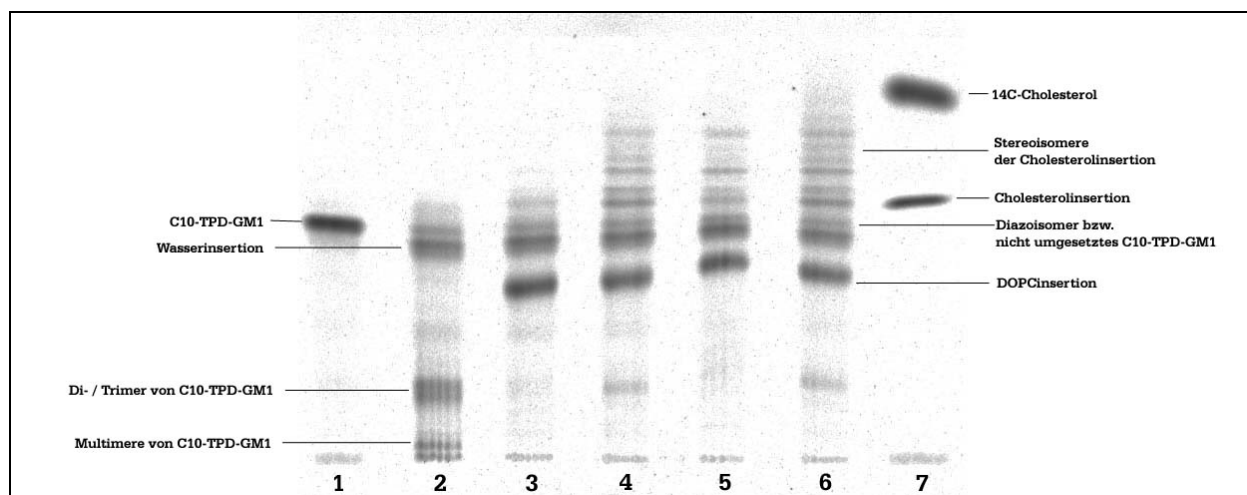
	Cholesterol		DOPC		Sonde	
	A	B	A	B	A	B
<b>Bahn 1</b>	-	-	-	-	100	-
<b>Bahn 2</b>	-	-	-	-	100	-
<b>Bahn 3</b>	10	<b>5,8<math>\pm</math>0,62</b>	88	<b>94,2<math>\pm</math>4,2</b>	2	-
<b>Bahn 4</b>	20	<b>36,3<math>\pm</math>2,1</b>	78	<b>63,7<math>\pm</math>3,5</b>	2	-
<b>Bahn 5</b>	30	<b>24,2<math>\pm</math>1,8</b>	68	<b>75,8<math>\pm</math>4,1</b>	2	-
<b>Bahn 6</b>	40	<b>48,2<math>\pm</math>3,2</b>	58	<b>51,8<math>\pm</math>3,7</b>	2	-
<b>Bahn 7</b>	50	-	-	-	50	-

Tabelle 3-3a: Zusammensetzung der Vergleichsliposomen für DOPC und Cholesterol mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 (in mol %)

<sup>1</sup> Hörschemeyer, J. (1998), Dissertation

Weiterhin ist auf diesem Chromatogramm (Abbildung 3-18) in Bahn 2  $C_{10}$ -TPD-GM1 aufgetragen. Dieses wurde aus wässriger Lösung im Ultrahochvakuum getrocknet und belichtet. Man kann man davon ausgehen, dass hiernach kleinere, nicht genauer definierbare Aggregate vorlagen, so dass nur Kristallwasser und benachbarte Sonden-Moleküle als Kopplungspartner in Frage kamen. Somit treten keine weiteren Kopplungsprodukte außer Pauci- und Multimeren von  $C_{10}$ -TPD-GM1 auf und man hat auf einfache Weise diese Nebenprodukte identifiziert. Die Quantifizierung der gefundenen Banden (ohne Normierung auf 100%) zeigt, dass zu 8% das Diazoisomer und zu 27% das Wasserinsertionsprodukt (mit Stereoisomer) entstanden ist. Bei den Multimeren der Sonde entstehen zu 26% die Di- oder Trimerkopplungsprodukte. Dabei wird hier nicht zwischen Diazo-Di-/Trimeren und Di-/Trimeren mit Wasserinsertion unterschieden, da die Laufunterschiede hierfür zu gering sind und es für weiterführende Untersuchungen keine Rolle spielt. Die restlichen Multimere wurden mit 7% quantifiziert. Die Identifizierung dieser „Mehrfach“-Kopplungsprodukte erfolgte nur im Falle der Di- und Trimeren massenspektrometrisch. Die Charakterisierung der Bande der möglichen Multimerenkopplung konnte nicht vorgenommen werden.

Als zusätzliche Kontrolle für die Kopplungsprodukte der Sonde mit Cholesterol wurde eine Mischung aus gleichen Teilen  $^{14}\text{C}$ -Cholesterol und nicht-radioaktiv markiertem  $C_{10}$ -TPD-GM1 belichtet. In Bahn 7 der Abbildung 3-18 ist diese Mischung aufgetragen. Man erkennt deutlich 2 radioaktive Banden. Diejenige mit höherem  $R_f$ -Wert zeigt dabei nicht umgesetztes  $^{14}\text{C}$ -Cholesterol. Die Bande unterhalb ist das Kopplungsprodukt von Cholesterol mit  $C_{10}$ -TPD-GM1. Andere Kopplungsprodukte, wie Pauci- oder Multimere, sowie Wasserinsertion und Diazoisomer sind nicht detektierbar, da die radioaktive Markierung im Cholesterol lokalisiert ist und nicht in der Photosonde.



**Abbildung 3-18:** Referenzliposomen aus  $C_{10}$ -TPD-GM1 mit DOPC und Cholesterol, sowie (un-)belichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1

- Bahn 1: Standard =  $C_{10}$ -TPD-GM1 unbelichtet  
 Bahn 2: Standard =  $C_{10}$ -TPD-GM1 belichtet  
 Bahn 3: DOPC/Cholesterol/Sonde - 88:10:2 (mol %)  
 Bahn 4: DOPC/Cholesterol/Sonde - 78:20:2 (mol %)  
 Bahn 5: DOPC/Cholesterol/Sonde - 68:30:2 (mol %)  
 Bahn 6: DOPC/Cholesterol/Sonde - 58:40:2 (mol %)  
 Bahn 7:  $^{14}C$ -Cholesterol und nicht-radioaktives  $C_{10}$ -TPD-GM1 1:1

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $CaCl_2$ /100 mM KCl – 50:50:4:8 (v/v/v/v)

Als weiteres wichtiges Membranlipid wurde Sphingomyelin in die Vergleichsliposomen mit einbezogen. Charakteristisch für Sphingomyelin-Kopplungsprodukte ist eine Doppelbande (siehe Abbildung 3-19), welche durch die oben beschriebenen Stereoisomerieeffekte entsteht. Auch hier findet man keine relevante Bevorzugung zwischen DOPC oder Cholesterol. Auffällig ist jedoch, dass im Gegensatz zum kurzkettigen  $C_5$ -TPD-GM1-Derivat beim  $C_{10}$ -TPD-GM1 anscheinend eine Präferenz zu Cholesterol und DOPC gibt (siehe Tabelle 3-3b). Es ist auffällig, dass die Kopplung mit Sphingomyelin deutlich weniger präferiert ist.

	Cholesterol		DOPC		SM		Sonde	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Bahn 1</b>	-	-	68	<b>78,8</b> ±3,4	30	<b>20,2</b> ±1,9	2	-
<b>Bahn 2</b>	30	<b>38,6</b> ±2,1	38	<b>42,7</b> ±2,7	30	<b>18,7</b> ±2,0	2	-
<b>Bahn 3</b>	-	-	-	-	-	-	100	-

**Tabelle 3-3b:** Zusammensetzung der Vergleichsliposomen für Cholesterol, DOPC und SM mit  $C_{10}$ -TPD-GM1 (in mol %), sowie unbelichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1 (Bahn 3)



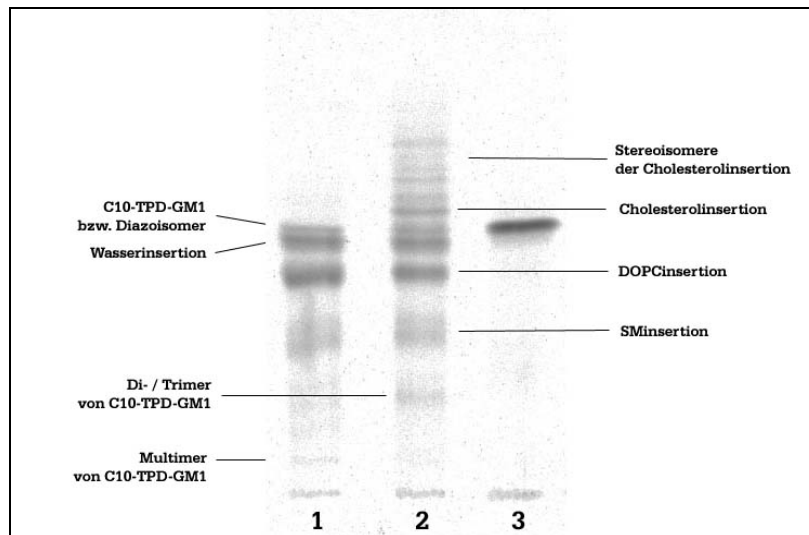


Abbildung 3-19: Vergleichsliposomen der  $C_{10}$ -TPD-GM1-Sonde mit DOPC, Cholesterol und SM

Bahn 1: DOPC/Sphingomyelin/Sonde - 68:30:2 (mol %)

Bahn 2: DOPC/Cholesterol/Sphingomyelin/Sonde - 38:30:30:2 (mol %)

Bahn 3 Standard =  $C_{10}$ -TPD-GM1 unbelichtet

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $CaCl_2$ /100 mM  $KCl$  – 50:50:4:8 (v/v/v/v)

Ein wichtiges Lipid für den Abbau von Gangliosiden, Sphingomyelin, Glucosylceramid und Ceramid ist anscheinend BMP. Nach bisherigen Untersuchungen vermutet man es auf intraendosomalen bzw. -lysosomalen Membranen.<sup>i</sup> So sollte man erwarten, dass in Zellversuchen es zu einem Kopplungsprodukt zwischen BMP und  $C_{10}$ -TPD-GM1 kommt. Daher war es vonnöten ein Referenzkopplungsprodukt von Photosonde mit BMP in Modellmembranen zu charakterisieren, um später eine einwandfreie Identifikation in natürlichen Zellmembranen zu gewährleisten. Zu beachten ist, dass in den Liposomenversuchen synthetisches BMP verwendet wurde (sn-(3-Oleoyl-2-Hydroxy)-Glycerol-1-Phospho-sn-3'-(1'-Oleoyl-2'-Hydroxy)- Glycerol (*Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA*). Dieses entspricht in seiner Konjugation nicht dem natürlichen BMP. In Untersuchungen des Laufverhaltens auf DCs fanden sich zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen dem natürlichen und dem synthetischen BMP.<sup>ii</sup> Jedoch zeigte sich, dass das Kopplungsprodukt des natürlichen BMP mit einer Glc-S-Cer-Photosonde das gleiche Laufverhalten aufwies, wie das Photoinsertionsprodukt mit synthetischem BMP.<sup>iii</sup> Man kann davon ausgehen, dass es sich bei den Experimenten mit GM1 ähnlich

<sup>i</sup> Wilkening, G. et al. (2000), J. Biol. Chem.

<sup>ii</sup> Schwarzwann, G. (2002) persönliche Mitteilung

<sup>iii</sup> Hömschemeyer, J. (2002), persönliche Mitteilung

verhält und somit der gefundene  $R_f$ -Wert als Referenz für Zelleexperimente dienen kann.

So findet man in Modellmembranen nach Normalisierung einen Anteil von 30 % Kopplungsprodukt der Sonde mit BMP. Da in beiden Vergleichsliposomen lediglich ein Anteil von 20 % bzgl. des Gesamtlipidanteils eingesetzt wurde, scheint es, als ob eine Affinität der GM1-Sonde zu BMP besteht (siehe Tabelle 3-3c).

	Cholesterol		DOPC		BMP		Sonde	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Bahn 1</b>	-	-	-	-	-	-	100	-
<b>Bahn 2</b>	-	-	78	<b>70,0<math>\pm</math>3,3</b>	20	<b>30,0<math>\pm</math>2,7</b>	2	-
<b>Bahn 3</b>	20	<b>10,8<math>\pm</math>0,9</b>	58	<b>59,2<math>\pm</math>2,6</b>	20	<b>30,0<math>\pm</math>2,5</b>	2	-

Tabelle 3-3c: Zusammensetzung der Vergleichsliposomen für Cholesterol, DOPC und BMP mit  $C_{10}$ -TPD-GM1 (in mol %), sowie unbelichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1 (Bahn 1)

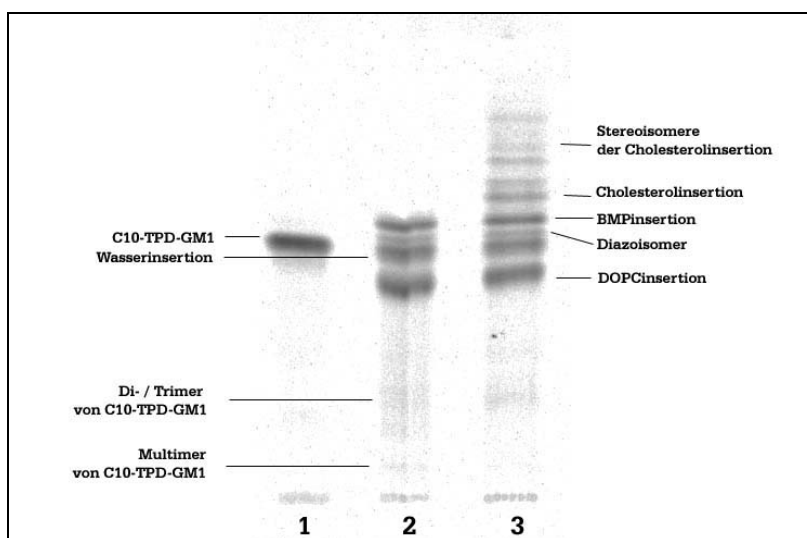


Abbildung 3-20: Vergleichsliposomen der  $C_{10}$ -TPD-GM1-Sonde mit DOPC, Cholesterol und BMP, sowie unbelichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1 (Bahn 1)

Bahn 1: Standard =  $C_{10}$ -TPD-GM1 unbelichtet

Bahn 2: DOPC/Bis(monoacylglycero)phosphat/Sonde - 78:20:30:2 (mol %)

Bahn 3: DOPC/Cholesterol/Bis(monoacylglycero)phosphat/Sonde - 58:20:20:2 (mol %)

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $CaCl_2$ /100 mM  $KCl$  50:50:4:8 (v/v/v/v)

In weiteren Experimenten sollten noch verschiedene Kombinationen von Lipiden untersucht und weitere saure Lipide in Liposomen eingebaut werden. In Liposomen mit Beimischung von Dioleyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) fällt auf, dass dieses

als Kopplungspartner bevorzugt wird (siehe Tabelle 3-3d). In Bahn 1 wurde eine 1:1 Mischung von DOPC und DOPE gewählt. Nach Belichtung findet man ein Verhältnis DOPE:DOPC von nahezu 4:1.

Auch wenn weitere Lipide in den Liposomen vorhanden sind, findet man hauptsächlich DOPE-Kopplungsprodukte (Bahn 2 der Tabelle 3-3d). Neben dieser Präferenz zu DOPE haben DOPC und Cholesterol annähernd gleiche Werte.

	Cholesterol		DOPC		SM		DOPE		Sonde	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Bahn 1</b>	-	-	49	<b>16,3±1,2</b>	-	-	49	<b>83,7±2,9</b>	2	-
<b>Bahn 2</b>	20	<b>10,8±0,9</b>	29	<b>10,6±0,8</b>	20	<b>6,2±0,6</b>	29	<b>72,4±2,6</b>	2	-
<b>Bahn 3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-

Tabelle 3-3d: Zusammensetzung der Vergleichliposomen für Cholesterol, DOPC, SM und DOPE mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 (in mol %)

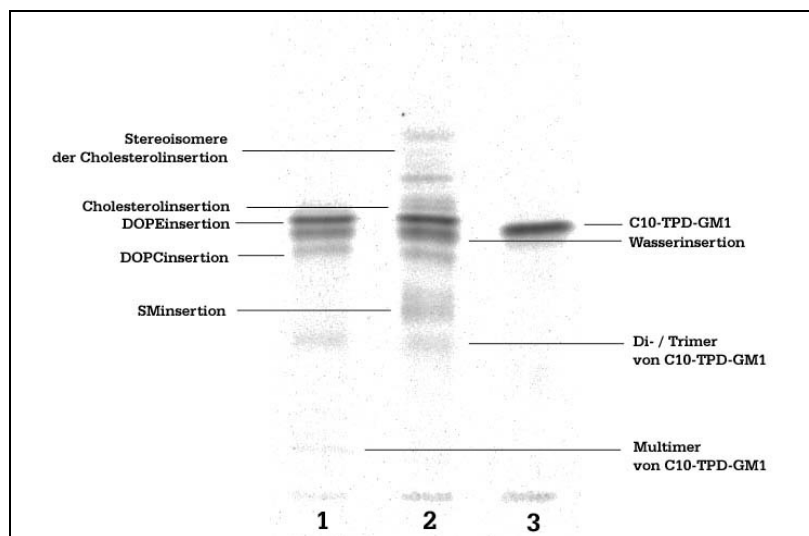


Abbildung 3-21: Dünnschichtchromatogramm der Referenzliposomen aus C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonde mit DOPC, Cholesterol, DOPE und SM, sowie unbelichtetes C<sub>10</sub>-TPD-GM1 (Bahn 3)

Bahn 1: DOPC/DOPE/Sonde - 49:49:30:2 (mol %)

Bahn 2: DOPC/Cholesterol/DOPE/SM/Sonde – 29:20:20:29:2 (mol %)

Bahn 3: Standard = C<sub>10</sub>-TPD-GM1 unbelichtet

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v)

Um diese Befunde näher zu untersuchen wurden weitere Experimente mit verschiedenen Mischungsverhältnissen durchgeführt. Da bei hohen Anteilen von DOPE in den Liposomen nicht auszuschließen ist, dass es zu Phasenbildungen

kommt, wurden weitere Versuche mit geringeren molaren Anteilen dieses Phospholipids in Liposomen gemacht. Dabei wurden nun zwar vermehrt Kopplungsprodukte mit DOPC gebildet (Tabelle 3-3e), allerdings im Verhältnis deutlich weniger, als es bei gleichverteilter Insertion in beide Lipide zu erwarten gewesen wäre.

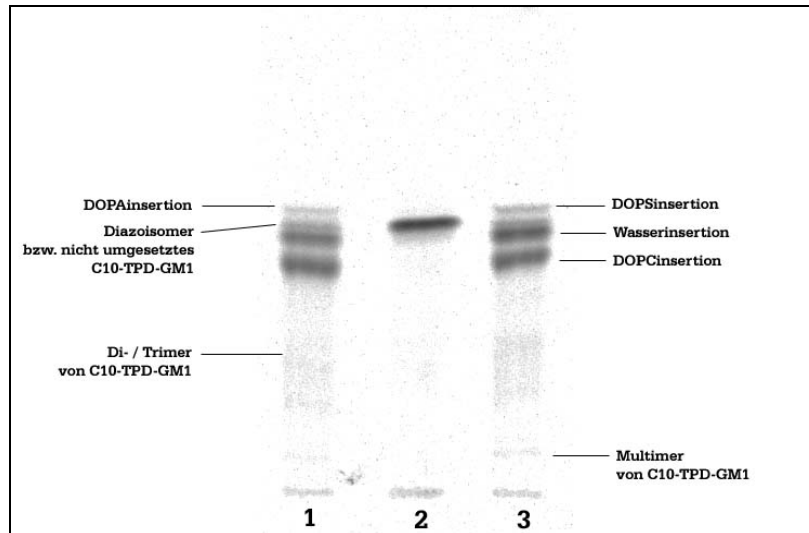
<b>Anteil in Liposomen (DOPC : DOPE)</b>	<b>berechnetes Verhältnis (DOPC : DOPE)</b>	<b>gefundene Insertion (DOPC : DOPE)</b>
30 : 68	1 : 6,8	1 : 10,3
49 : 49	1 : 1	1 : 5,1
78 : 20	3,9 : 1	2,9 : 1
88 : 10	8,8 : 1	6,2 : 1

**Tabelle 3-3e:** Liposomenexperimente mit DOPC und DOPE als Wirtlipide. Die Mischungen enthielten zusätzlich je 2 Mol-% C<sub>10</sub>-TPD-GM1

Zum Vergleich zu DOPE, welches Zwitterion ist, sollten nun negative Lipide als Kopplungspartner untersucht werden. Bei den Experimenten mit DOPA, DOPC und DOPS war besonders die niedrige Insertionsrate von DOPA und DOPS auffällig (Tabelle 3-3f). Im Gegensatz zu DOPE weisen Dioleylphosphatidylsäure (DOPA) und Dioleylphosphatidylserin (DOPS) nur sehr geringe Kopplungsraten mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 auf. In Liposomen mit DOPC findet man daher die Insertion in DOPC als Hauptkopplungsprodukt.

	<b>DOPC</b>		<b>DOPA</b>		<b>DOPS</b>		<b>Sonde</b>	
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<b>Bahn 1</b>	68	<b>93,4±3,5</b>	30	<b>6,6±1,6</b>	-	-	100	-
<b>Bahn 2</b>	-	-	-	-	-	-	100	-
<b>Bahn 3</b>	68	<b>95,4±3,2</b>	-	-	30	<b>4,6±0,9</b>	2	-

**Tabelle 3-3f:** Zusammensetzung der Vergleichliposomen für Cholesterol, DOPC, SM und DOPE mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 (in mol %)



**Abbildung 3-22:** Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der  $C_{10}$ -TPD-GM1-Sonde mit DOPC, DOPA und DOPS, sowie unbelichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1 (Bahn 2)

Bahn 1: DOPC/DOPA/Sonde – 68:30:20:2 (mol %)

Bahn 2: Standard =  $C_{10}$ -TPD-GM1 unbelichtet

Bahn 3: Standard = DOPC/DOPS/Sonde – 68:30:20:2 (mol %)

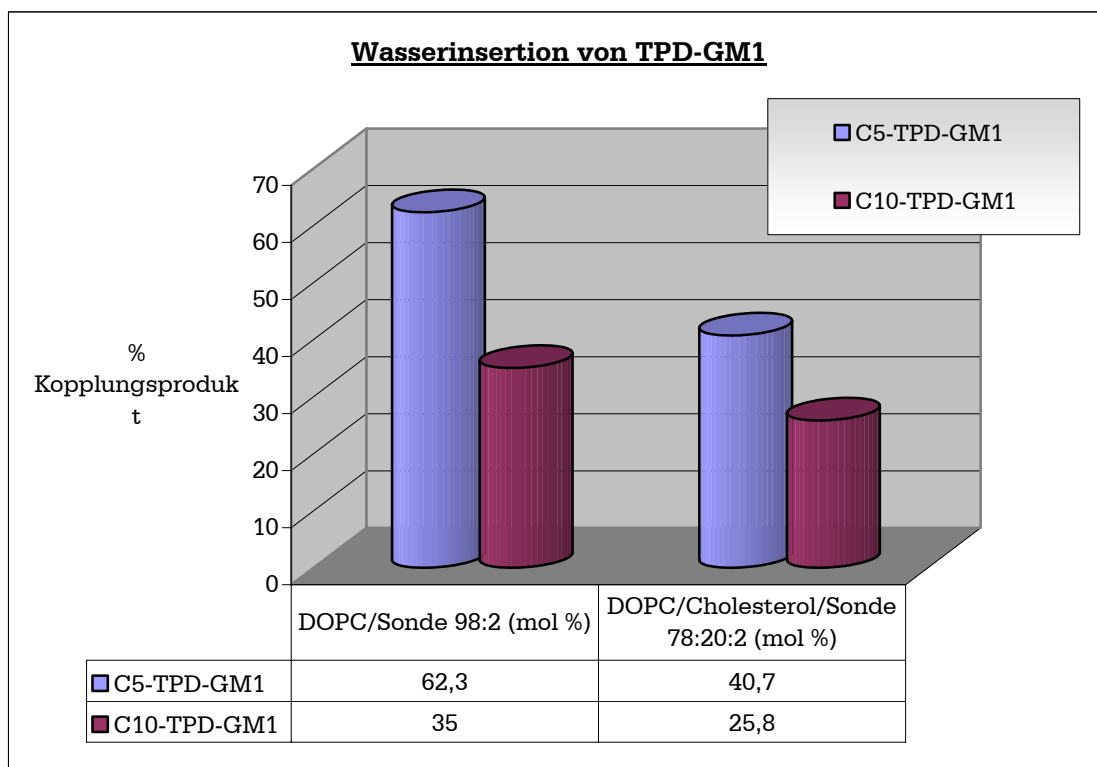
Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $CaCl_2$ /100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v)

### 3.4.2.3 Untersuchungen zur Photoinsertion in Wasser

In den vorherigen Kapiteln wurde mehrfach die Insertion der photoaktiven GM1-Sonden in Wasser angesprochen. Diese Insertion ist in nahezu allen Liposomenexperimenten eine der prominentesten Banden, wenn nicht sogar Hauptprodukt der Photoinsertion. Gerade in den Liposomenexperimenten mit dem kürzerkettigen Derivat wurden relativ hohe Prozentwerte für die Insertion in Wasser erhalten. Für die Quantifizierung der Lipidbestandteile spielt die Wasserinsertion keine Rolle und wurde daher aus den Berechnungen herausgezogen. Allerdings wurde bereits in früheren Veröffentlichungen auf das Auftreten der Wasserinsertionsprodukte in Liposomen und Mikrosomen aus Kälberhirn hingewiesen.<sup>1</sup>

So wurde im folgenden der Einfluss der Acylkettenlänge der Photosonde auf die Wasserinsertion untersucht. Dazu wurden DOPC-Liposomen und DOPC/Cholesterol-Liposomen mit 2 Mol-% der jeweiligen TPD-GM1-Photosonde<sup>1</sup> bei 25°C präpariert und belichtet.

<sup>1</sup> Meier, E.M. et al. (1990), Chem. Phys. Lipids



**Diagramm 3-1:** Wasserinsertion der TPD-GM1-Sonden in Abhängigkeit der Acylkettenlänge. Die Liposomen bestehend aus 98 Mol-% DOPC bzw. 78% DOPC, 20% Cholesterol und je 2 Mol-% Sonde wurden bei 25°C hergestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kopplung mit Wasser aus einer Doppelbestimmung.

In Diagramm 3-1 sind reine DOPC-Liposomen im Vergleich zu DOPC/Cholesterol-Liposomen dargestellt. Man erkennt, dass in den reinen DOPC-Liposomen ein weitaus höherer Prozentsatz an Wasserinsertion auftritt als in Liposomen, die Cholesterol enthielten. Dies mag auf Konkurrenzreaktionen zurückzuführen sein, oder auf eine geringere Wasserkonzentration bzw. auf eine geringere „off-rate“ der Sonde in Cholesterol-haltigen Liposomen. Außerdem sieht man in Diagramm 3-1, dass die C<sub>10</sub>-TPD-GM1 im Vergleich zur kürzerkettigen C<sub>5</sub>-Verbindung eine geringere prozentuale Wasserinsertionsrate aufweist. Ein Wassergehalt in einer Liposomenmembran von über 60 Mol-% (wie es in DOPC-Liposomen mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1 ist) ist jedoch eher unwahrscheinlich. Vielmehr kann ein Teil dieser Insertionsprodukte durch die „off-rate“ der Sonden in das die Membranen umgebende Wasser und anschließender Photokopplung entstehen. Sollte dieser Effekt für das Auftreten der Wasserinsertionsprodukte überwiegend verantwortlich sein, müsste es bei einer zunehmend festeren Verankerung in der Membran zu einer Verringerung dieser Kopplungsprodukte kommen. Auf Grund der längere Fettsäure werden mehr *van der Waals*-Wechselwirkungen mit den umgebenden Molekülen eingegangen, was

wiederum zu einer stärkeren Verankerung der längerkettigen Photosonden im hydrophoben Bereich der Membranen führt. Auch ist wahrscheinlich in den inneren Bereichen der Membran ein geringerer Anteil an Wasser vorhanden. Dies würde zu einer Ausbildung eines Gradienten der Wasserkonzentration in der Membran führen. In einem solchen Fall würde die C<sub>10</sub>-Sonde, deren TPD-Gruppe im tieferliegenden Bereich und somit wasserärmeren Teil lokalisiert ist, ebenfalls eine geringere Insertionsrate in Wasser zeigen.

Gleichzeitig kann durch diese Experimente ein Herausragen der Photosonden in die wässrige Phase („looping-back“) nach diesen Ergebnissen als vernachlässigbar angesehen werden. Dieser Effekt, hervorgerufen durch *gauche/gauche*-Konformation der Fettsäuren müsste die Wasserinsertion bei einer längeren Kette und somit größerer Anzahl von Freiheitsgraden erhöhen.

#### 3.4.2.4 Bestimmung der R<sub>f</sub>-Werte der gefundenen Photokopplungsprodukte in Modellmembranen

In der nachfolgenden Tabelle 3-4 werden alle dargestellten Kopplungsprodukte und deren dünn-schichtchromatographische R<sub>f</sub>-Werte aufgeführt. Bei Doppel- oder Mehrfachbanden ist jeweils in Fettdruck die prominenteste Bande angegeben:

Insertionsprodukt	C <sub>5</sub> -TPD-GM1	C <sub>10</sub> -TPD-GM1
Diazoisomer	0,58	0,55
Wasser	0,51 / <b>0,53</b>	0,49
Paucimere	0,24	0,15 / 0,17
Multimere	0,12	0,02
BMP	-	0,58
Cholesterol	<b>0,62</b> / 0,65 / 0,67 / 0,79	<b>0,61</b> / 0,62 / 0,66 / 0,71 / 0,76
DOPA	-	0,60
DOPC	0,47	0,41
DOPE	-	0,59
DOPS	-	0,60
SM	<b>0,34</b> / 0,37	<b>0,32</b> / 0,35

Tabelle 3-4: R<sub>f</sub>-Werte der Kopplungsprodukte der C<sub>5</sub>- und C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonden ermittelt von HPTLC-Platten mit Laufmittel Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v).

Man erkennt, dass gerade im Bereich der Lipide nur ein sehr begrenzter Bereich für eine genaue Charakterisierung zur Verfügung steht. Um exakte Ergebnisse zu erhalten, muss entweder - wie hier geschehen - mit sehr geringen Mengen (ca. 200 pmol/Bahn = 1500 CPM) auf HPTLC-Platten gearbeitet oder bei größeren Mengen eine längere Laufstrecke gewählt werden. Dies beinhaltet aber auch immer diffusere Banden, was das Ergebnis wiederum verfälschen kann.

Eine genaue Charakterisierung kann daher nur durch Extrahieren der jeweiligen Bande aus dem Kieselgel (siehe Kapitel 5.2.2.3) und anschließender massenspektrometrischer Vermessung erfolgen.

#### **3.4.2.5 Massenspektrometrische Untersuchung der gefundenen Banden durch MALDI-TOF-MS**

Die Untersuchung der extrahierten Banden erfolgte mittels MALDI-TOF-MS, welches ein schonendes und weiches Ionisationsverfahren darstellt. Durch Einbettung in eine Matrixsubstanz bzw. Ionisation in Flüssigkeit entstehen während der Messung wenig Fragment-Ionen, so dass die meisten Kopplungsprodukte durch ihre Molargewichte in den Spektren gut nachgewiesen werden konnten. Im Falle der Glykolipide fand man, wie für die Substanzklasse üblich, im überwiegenden Maße Alkalimetall-Addukte der Moleküle als Hauptpeaks im Spektrum.

In folgenden Tabellen sind die Kopplungsprodukte aufgeführt (als Na<sup>+</sup>- bzw. K<sup>+</sup>-Addukte), die durch ihre entsprechenden Molekülpeaks und z.T. auch durch charakteristische Fragmente eindeutig identifiziert werden konnten.

Ein weiterer Vorteil von MALDI-TOF-MS-Messungen sind die geringen Probenmengen, die für eine Messung benötigt werden. So genügten bei einfachen Messungen ca. 10 pmol Probensubstanz (ESI-MS u.U. auch weniger). Als Störfaktor haben sich jedoch die Mengen an kolloidal gelöstem Kieselgel erwiesen, welche nach vorhergehender Kieselgel-Extraktion trotz gründlicher Präparation immer noch vorhanden waren. Nach Verdunsten des Lösungsmittels der Proben auf dem Trägertarget fallen diese aus und stören erheblich den Desorptions- und Ionisationsvorgang während der Messung. Im Fall der Nano-ESI-Massenspektrometrie führen Kieselgelspuren zum Verstopfen der feinen Kapillare und somit zum Abbruch der Messung. Daher wurden zur Präparation größere Probenmengen per DC (ca. 500 pmol pro Bande) verwendet und mit einer größeren



Menge Lösungsmittel (20 bis 50  $\mu\text{l}$ ) als zuvor (max. 10  $\mu\text{l}$ ) für MALDI-MS-Messungen auf eine Konzentration von ca. 25 pmol/ $\mu\text{l}$  in Methanol oder Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) eingestellt (ESI-MS 10 pmol/ $\mu\text{l}$  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.

Die Messung der unbelichteten Sonden konnte nicht mit dem MALDI-MS durchgeführt werden, da dieses einen  $\text{N}_2$ -Laser mit der Wellenlänge 337 nm verwendet. Wie in Kapitel 3.4.1 gezeigt hat die Diazirin-Gruppe ein Absorptionsmaximum bei 360 nm. Bei der Messung wird es *in situ* photolysiert und es kommt auf dem Probenträger zu Folgereaktionen. Man erhält daher ein komplexes Spektrum, dessen Peaks nicht eindeutig zugeordnet werden können. Daher musste die Charakterisierung der GM1-Sonden nach der Synthese auch über ESI-MS-Messungen erfolgen. Hier tritt in geringerem Maße zwar ein ähnlicher Effekt auf, da die Beladung und Justage der Kapillare bei hellem Licht erfolgte, kann es zu einer partiellen Photolyse und Umlagerungen kommen.

Eine einfachere Methode zur Charakterisierung der Sonde gelang, durch Belichten der Sonde in Methanol. Bei genügend großer Verdünnung erhält man quantitativ das Kopplungsprodukt der Sonde mit Methanol, welches leicht massenspektrometrisch zu charakterisieren ist. In Tabelle 3-5 sind die durch MALDI-MS bestimmten Kopplungsprodukte der beiden TPD-GM1-Sonden aufgeführt. In den Spektren waren jeweils beide Längen der Alkylkette des Sphingoidteils wiederzufinden, wobei das längererkettige ( $\text{C}_{20}$ ) einen leicht höheren Anteil aufwies.

Kopplungsprodukt	FS-Länge	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}+\text{K}]^+$
	in Cer	berechnet	gemessen	gemessen
$\text{C}_5$ -TPD-GM1 + MeOH	$\text{C}_{18}$	1575,82	1575,66	n.d.
	$\text{C}_{20}$	1603,69	1603,68	1619,71
$\text{C}_{10}$ -TPD-GM1 + MeOH	$\text{C}_{18}$	1645,77	1645,80	n.d.
	$\text{C}_{20}$	1673,82	1673,82	n.d.

Tabelle 3-5: Photokopplungsprodukte der GM1-Sonden in Methanol ( $\geq 99,9\%$  CHROMASOLV)

Daneben traten noch weitere Kombinationen von Kopplungsprodukt und Alkalimetallkation auf (z.B.  $[M+2Na-H]^+$  oder  $[M+Na+K-H]^+$ , die aber hier nicht aufgeführt werden.

In Tabelle 3-6 sind die Kopplungsprodukte von C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonden mit diversen Lipiden aufgeführt. Der Übersichtlichkeit halber werden hierbei nur die Produkte der TPD-Sonde mit längerer Alkylkette im Sphingoidteil (C<sub>20</sub>) angegeben, da diese im Spektrum den jeweils prominenteren Peak aufwiesen. Auch werden nur die Natrium- und die Kaliumaddukte (sofern detektiert) angegeben.

<b>Kopplungsprodukt</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup> gemessen</b>	<b>[M+K]<sup>+</sup> gemessen</b>
C <sub>5</sub> -TPD-GM1 + Wasser	1589,65	1589,60	n.d.
C <sub>5</sub> -TPD-GM1 + Cholesterol	1958,31	1958,44	1974,47
C <sub>5</sub> -TPD-GM1 + DOPC	2357,78	2357,81	2373,84
C <sub>5</sub> -TPD-GM1 + SM	2302,74	2302,68	n.d.
C <sub>5</sub> -TPD-GM1-Dimer + Wasser	3137,32	3137,29	3153,34

**Tabelle 3-6:** Massen der Kopplungsprodukte der C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonden mit einer Sphingoidkettenlänge von C<sub>20</sub>; ermittelt von extrahierten Banden aus HPTLC-Platten.

Für das langkettige C<sub>10</sub>-TPD-GM1 wurden folgende Kopplungsprodukte charakterisiert und in Tabelle 3-7 aufgeführt. Da bei diesen Referenzliposomen das Kopplungsprodukt des TPD-GM1-Derivates mit kürzerer C<sub>18</sub>-Kette im Sphingoidteil den prominenteren Peak aufwies, werden hier die Natrium- und die Kaliumaddukte dieser Photosonde angegeben.

<b>Kopplungsprodukt</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup> gemessen</b>	<b>[M+K]<sup>+</sup> gemessen</b>
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + Wasser	1631,73	n.d.*	n.d.*
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + Cholesterol	2000,39	2000,38	2016,41
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + DOPC	2399,86	2400,02	2416,05
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + SM	2344,82	2344,68	2360,72

C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + DOPA	2313,70	2313,68	n.d.
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + DOPE	2357,78	2357,55	2373,50
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + DOPS	2400,78	2400,92	n.d.
C <sub>10</sub> -TPD-GM1 + BMP	2387,78	2387,55	n.d.
C <sub>10</sub> -TPD-GM1-Dimer + Wasser	3221,48	3221,40	3237,53
C <sub>10</sub> -TPD-GM1-Trimer + Wasser	4811,23	4811,16	n.d.

Tabelle 3-7: Massen der Kopplungsprodukte der C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonden mit einer Sphingoidkettenlänge von C<sub>18</sub> ermittelt von ausgekratzten Banden aus HPTLC-Platten.

Im Falle der Wasserinsertion konnte nur der Molekülpeak (ohne Alkaliaddukt) detektiert werden:  $[M-H]^+ = 1608,75$  (berechnet: 1608,34).

### 3.5 Zellversuche mit photoaktiven GM1-Derivaten

Nachdem durch Charakterisierung der Kopplungsprodukte der TPD-GM1-Derivate mit verschiedenen Lipiden eine Referenzbibliothek erstellt worden waren, konnten nun Zellversuche folgen.

Bei den kurzkettigen Derivaten konnte unter Temperaturblock der Endozytose gearbeitet werden, so dass hier die Möglichkeit bestand, kinetisch orientierte Experimente durchzuführen.

Die langkettigen Sonden bieten auf Grund ihrer geringeren „off-rate“ die Chance ihre Lipidumgebung in intraendosomalenen bzw. -lysosomalenen Membranen zu untersuchen. Der Grund dafür besteht darin, dass, wie schon erwähnt, nur die kurzkettigen Verbindungen (z.B. mit C<sub>8</sub>-Acylketten) das Lysosom verlassen und im Golgi-Apparat glykosyliert werden können, während die längerkettigen Derivate im Lysosom verblieben und somit in den Zellen gespeichert wurden.<sup>i</sup>

<sup>i</sup> Schwarzmann, G. (2001), Semin. Cell Dev. Biol.

### ***3.5.1 Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten***

Für die Untersuchung der Einbaumenge des GM1-Derivats wurden die Photosonden den kultivierten Fibroblasten exogen als stöchiometrischer 1:1-Lipid/BSA-Komplex angeboten. Der Komplex wurde den Zellen unter Temperaturblock der Endozytose 90 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss angeboten, wonach eine für die weiteren Bearbeitungsschritte ausreichende Menge der Sonden (siehe Tabelle 3-8) in die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran inkorporiert wurde. 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. Dabei hängt die Menge der in die Plasmamembran inkorporierten Sonden neben der Dauer der Inkubation auch von der Temperatur ab. Zwischen der Inkorporation in die Membran und Adsorption an BSA besteht ein Verteilungsgleichgewicht, welches sich bei niedrigen Temperaturen während der Inkubation langsamer einstellt. Ebenso darf man davon ausgehen, dass der Dissoziationsgrad des Lipid/BSA-Komplexes bei niedrigen Temperaturen abnimmt, so dass sich die Sonden schwerer aus dem Komplex lösen. Durch diese beiden Faktoren werden bei niedrigen Temperaturen weniger Moleküle in die Plasmamembran inkorporiert. Daher war es von Bedeutung nachzuweisen, ob für spätere Detektion der Kopplungsprodukte auf DC und ihrer massenspektrometrischen Charakterisierung genügend Material in die Zelle inkorporiert wurde. Dazu wurde, wie Tabelle 3-8 zeigt, bei verschiedenen Inkubationsdauern die Einbaurate von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in die Plasmamembran von humanen Fibroblasten normaler Probanden bestimmt.

Inkubationsdauer (in min)	Einbauraten (in nmol Lipid / mg Protein)
60	7,3 ± 1,1
90	14,7 ± 1,3
120	16,2 ± 0,7

**Tabelle 3-8:** Einbauraten der C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde in humane Fibroblasten bei 4°C in Abhängigkeit der Inkubationsdauer (Mittelwerte aus 6 Zellschalen).

Die Zellen wurden jeweils mit einer 10<sup>-5</sup> M Lösung aus 20 nmol C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in 2 ml eines Mediums aus DMEM und 0,3% fötalem Kälberserum (FKS) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 60-90 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen belichtet und mehrmals mit einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen geerntet. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet erneut mit PBS-Lösung gewaschen und in Wasser suspendiert. Aus dieser Suspension wurde durch Szintillationszählung eines Aliquots die Radioaktivitätsmenge bestimmt. Eine Proteinbestimmung wurde sowohl nach der Methoden von Bradford, als auch durch BCA-Bestimmung durchgeführt.

Die Fehlerbreite in den Versuchen lassen sich eher auf systematische Fehler, als auf unterschiedliche Einbauraten der Zellen zurückführen. Fehler können zum einen durch relativ ungenaue Proteinbestimmungen aus Zellhomogenaten kommen; denn nach Homogenisierung mit einer Pipettenspitze liegen immer noch größere Zelltrümmer vor, die die Messung verfälschen und zu „Ausreißen“ führen können. Zum anderen sind Fehler bei Proteinbestimmungen generell hoch, so dass bei mehreren Experimenten die Ergebnisse zu höheren oder tieferen Werten verschoben sein können. Eingesetzt wurden jeweils 20 nmol Lipid pro Zellschale (75 cm<sup>2</sup>).

Man sieht, dass nach 90 Minuten im Vergleich zu einer kürzeren Inkubationszeit ein deutlicher Anstieg der Einbaurate zu verzeichnen ist. Sind nach 60 Minuten erst ca. 35 Prozent des Lipids inseriert, kommt es in den folgenden 30 Minuten zu einer hundertprozentigen Steigerung. So sind nach 90 Minuten 73,5 % der Ausgangsmenge inseriert. Danach kommt es kaum noch zu einer signifikanten Steigerung. Nach 120 Minuten sind 81 % Lipid eingebaut. Generell kann also davon ausgegangen werden, dass nach einer neunzigminütigen Inkubation genügend Material für Detektion und Charakterisierung der Kopplungsprodukte von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in die Zellmembran inkorporiert wurde.

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass Glucosyl-thio-ceramide auf Grund der thioglykosidischen Bindung durch die

Glucocerebrosidase nicht gespalten werden.<sup>i</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass Glucosylceramide, welche einen [<sup>14</sup>C]-Oktansäurerest tragen, auch zelltypspezifisch glykosyliert werden.<sup>ii</sup> Bei Untersuchungen mit GM1- und GM3-Derivaten, die ebenfalls eine thioglykosidische Bindung zum Ceramid trugen, konnte beobachtet werden, dass diese in Fibroblasten bis zum Glucosyl-thio-ceramid abgebaut wurden.<sup>iii</sup> Weiterhin wurde gezeigt, dass nur die kurzkettigen Verbindungen (z.B. mit C<sub>8</sub>-Acylketten) das Lysosom verlassen und im Golgi-Apparat glykosyliert wurden. Längerkettige Derivate verblieben dagegen im Lysosom und wurden somit in den Zellen gespeichert.<sup>iii</sup> Es ist daher wichtig zu wissen, ob die hier verwendeten Photosonden unter den gewählten Zellkulturbedingungen stabil sind. Daher wurde der Metabolismus dieser Sonden untersucht; denn im Falle einer starken Verstoffwechslung würden die Stoffwechselprodukte Kopplungsmuster erzeugen, die die komplexen Bandenmuster weiter verkomplizieren, so dass diese u.U. nicht mehr auswertbar wären.

In vorhergehenden Versuchen konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass selbst nach einer sechsständigen Inkubation die Photosonden der Glc-S-Cer-Derivate unter den gewählten Zellkulturbedingungen stabil sind.<sup>iv</sup> In diesen Versuchen wurden die Sonden für 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. Es konnte gezeigt werden, dass nach dieser Inkubationszeit überwiegend das noch nicht-verstoffwechselte Lipid vorhanden war. Insgesamt wurden hier nur geringe Mengen der TPD-Sonden glykosyliert. Auf Grundlage dieser Studien kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die komplexen Gangliosidsonden nicht anders verhalten und man im Rahmen der gewählten Inkubations- und Endozytosezeiten keine oder nur sehr geringe Abbauprodukte wiederfindet (siehe Kapitel 3.5.2). So wurden humane Fibroblasten für 36h mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 inkubiert. Die Lipidextrakte wurden ohne Belichtung dünnschichtchromatographisch untersucht. Im Falle einer Verstoffwechslung sollten neben einer Bande von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 weitere radioaktive

---

<sup>i</sup> Albrecht, B. et al. (1995), Carbohydr. Res.

<sup>ii</sup> Schwarzmann, G. et al. (1995), J. Biol. Chem.

<sup>iii</sup> Schwarzmann, G. (2001), Semin. Cell Dev. Biol.

<sup>iv</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

Banden auftreten. In Abbildung 3-28 und 3-29 sieht man, dass weder ein Abbau zu GM2, noch ein nachweisbarer Aufbau zu GD1a stattgefunden hat.

### 3.5.1.1 Untersuchung der Lipidumgebung von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in der Plasmamembran humaner Fibroblasten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Lipiddoppelschicht asymmetrisch aufgebaut. In der zytosolisch orientierten Lipidschicht findet sich eine andere Zusammensetzung als in der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite. Auf der äußeren Seite sind im überwiegenden Maße Phosphatidylcholin und Sphingomyelin lokalisiert, während die zytosolische Seite Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure trägt. Die Gruppe der Glykosphingolipide ist bis auf das Glucosylceramid hingegen streng extrazellulär orientiert. In diesem Abschnitt sollte die Lipidnachbarschaft der Glykosphingolipide in der Plasmamembran von humanen Fibroblasten untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1 90 Minuten bei 4°C inkubiert, wobei die Lipidmoleküle in die extrazelluläre Seite der PM inkorporiert wurden. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen belichtet. Da GM1-Sonden auf Grund ihrer hydrophilen Kopfgruppe nicht zu einer spontanen transversalen Diffusion („flip-flop“) fähig sind, darf man davon ausgehen, dass sie sich nur in der extrazellulären Seite der PM aufhalten. Damit erwartet man bei diesen Insertionsexperimenten in die Plasmamembran auch überwiegend Kopplungsprodukte mit PC, SM und Cholesterol. Betrachtet man den Anteil der Phospholipide an der Plasmamembran humaner Fibroblasten, ergeben sich Werte von ca. 50 % vom Gesamtlipidanteil. Davon wiederum sind ca. 40 % Phosphatidylcholin und 16 % Sphingomyelin.<sup>1</sup> Für Cholesterol werden in der Literatur sehr unterschiedliche Werte angegeben. Je nach Bestimmungsmethode erhält man Werte zwischen 30 und 40 Mol-%. Höhere Konzentrationen führen vermutlich zur Ausbildung von hexagonalen Phasen und zur Destabilisierung der Membran.

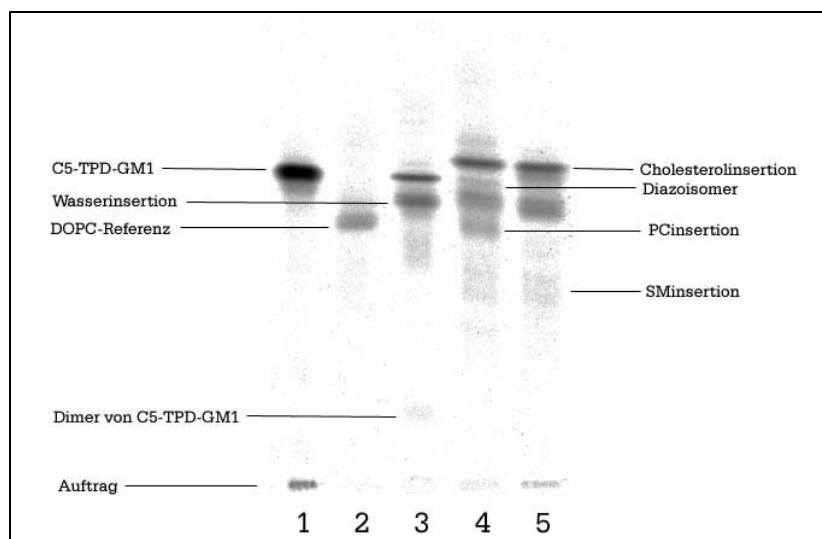
Damit ergibt sich ein theoretisches Verhältnis der Kopplungsprodukte der Photosonde mit Cholesterol:PC:SM von etwa 2:1:1 (für die äußere Membranälftte).

---

<sup>1</sup> van Meer, G. und van Genderen, I.L. (1994), Subcellular biochemistry, Vol. 23, Physicochemical methods in the study of biomembranes

Dieses würde bei einer Gleichverteilung der Lipide in der extrazellulären Seite der Plasmamembran gelten.

Die Abbildung 3-23 und die Auswertung der gefundenen Photokopplungen in Diagramm 3-2 zeigen jedoch ein völlig anderes Bild. Als Hauptprodukt wurden die Kopplungsprodukte von TPD-GM1 mit Cholesterolf gefunden. Die Photoinsertionen in PC und SM als Hauptlipide dieser Membranhälfte konnten mit geringem Anteil gefunden werden.



**Abbildung 3-23:** Plasmamembran-Markierung von humanen Fibroblasten mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde. 90 Minuten Fütterung von 10  $\mu$ M C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Photosonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM an humane Fibroblasten bei 4°C unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung.

Bahn 1: Unbelichtete C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde

Bahn 2: Referenzen: Wasserinsertionsprodukt

Bahn 3: Referenzen: Insertion in DOPC

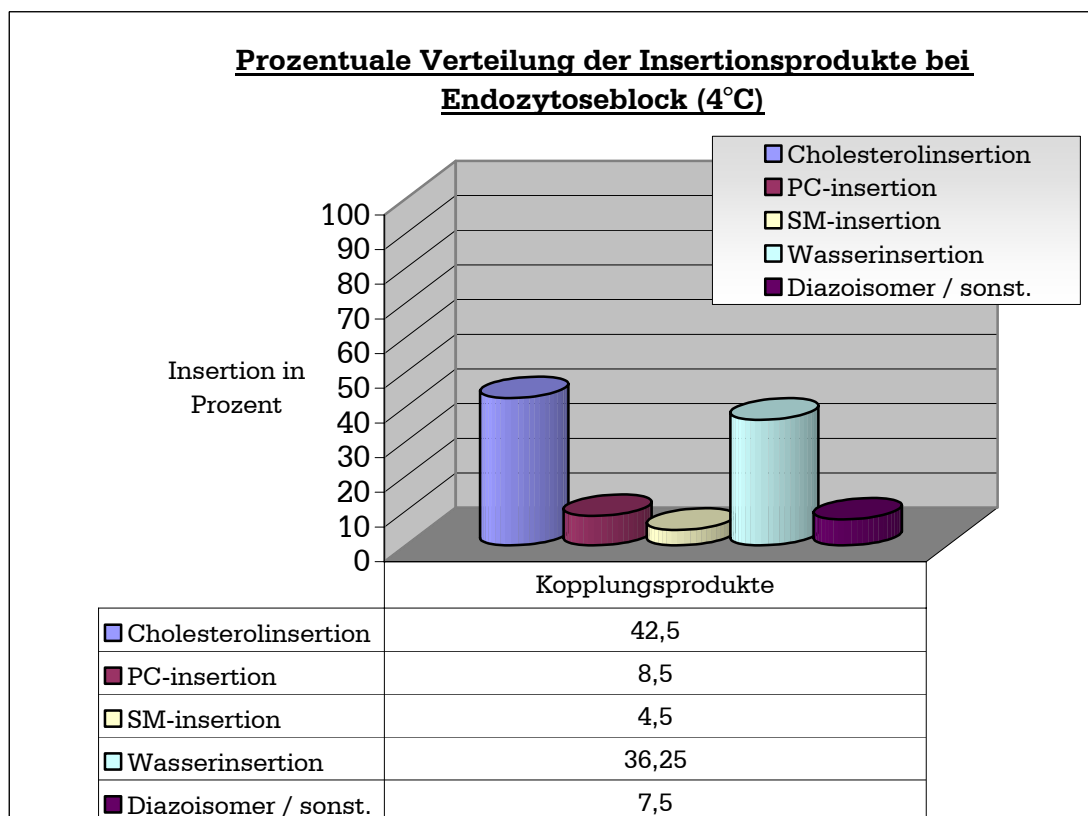
Bahn 4: Zellextrakte nach Belichtung bei 4°C

Bahn 5: Zellextrakte nach Belichtung bei 4°C und alkalischer Hydrolyse

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 50:50:10 (v/v/v)

Diagramm 3-2 zeigt das Ergebnis der Auswertung der gefundenen Photokopplungen mit den Lipiden aus Abbildung 3-23. Aufgeführt sind die Werte der Quantifizierung der Banden nach dünnschichtchromatographischen Trennung :



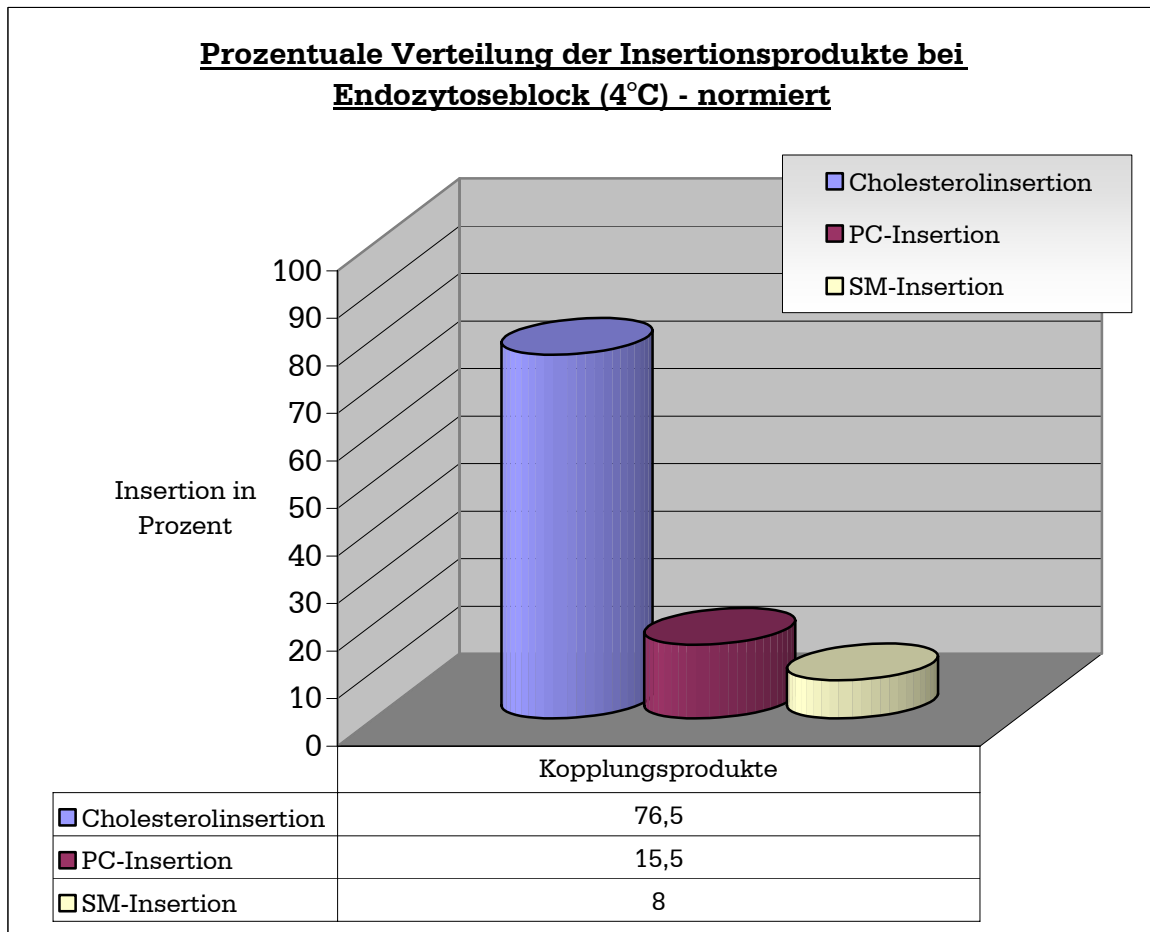


**Diagramm 3-2:** Prozentuale Verteilung der Insertionsprodukte von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in der Plasmamembran nach 90 Minuten Inkubation von mit 10 μM C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in HMEM bei Endozytoseblock (4°C) unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 0°C; Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

Es wird ersichtlich, dass ein gänzlich anderes Verhältnis der Kopplungsprodukte erhalten wurde, als es bei einer Gleichverteilung der Lipide in der PM zu vermuten war. Als Hauptprodukt wurde mit 42,5 % Anteil an der Gesamtradioaktivität der Bahn Kopplungsprodukte von TPD-GM1 mit Cholesterol gefunden. Dahingegen sind die Anteile der Photokopplungen mit PC und SM, welche die weiteren Hauptlipide dieser Membranhälfte stellen, nur mit 8,5 % bzw. 4,5 % vertreten. Die Wasserinsertion entspricht mit 36,25% ungefähr dem Anteil, der auch in den Referenzliposomen (40,5%) gefunden wurde. Das Diazoisomer bzw. nicht umgesetztes C<sub>5</sub>-TPD-GM1 konnte mit 7,5% nachgewiesen werden.

Berücksichtigt man nur die drei Kopplungsprodukte, die mit Lipiden der äußeren Membranschicht entstehen, erhält man nach Normierung abzgl. Wasserinsertion und Diazoisomer folgende prozentuale Verteilung: Cholesterol 76,5 %, PC 15,5 % und SM 8 % (siehe Diagramm 3-3).

Das entspricht einem Verhältnis der Kopplungspartner von photolysiertem C<sub>5</sub>-TPD-GM1 mit Cholesterol:PC:SM von etwa 9,5 : 1,9 : 1.



**Diagramm 3-3:** Prozentuale Verteilung der Insertionsprodukte von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in der Plasmamembran nach 90 Minuten Inkubation von mit 10 μM C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in HMEM bei Endozytoseblock (4°C) - nach Normierung abzgl. Wasserinsertion und Diazoisomer.

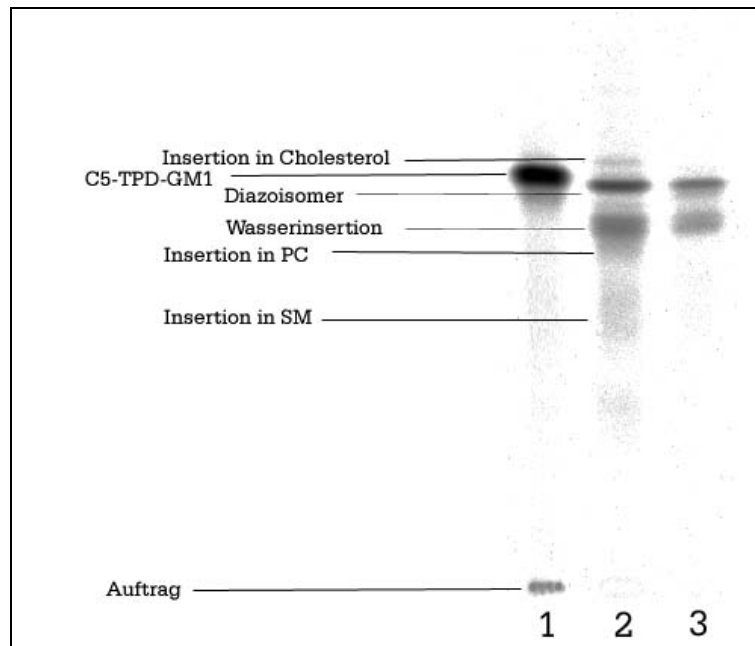
Bei einer Gleichverteilung der Lipide innerhalb der Plasmamembran und einer stöchiometrischen Kopplung sollte eine solche Zusammensetzung nicht vorkommen; man hätte in diesem Fall ein Verhältnis von 2 : 1 : 1 (Cholesterol:PC:SM) der Photoinsertionsprodukte mit TPD-GM1 erwarten dürfen. Außerdem zeigen die GM1-Photosonden in Modellmembranen keine präferenzielle Insertion in Cholesterol (siehe Kapitel 3.4.2.1). Daher kann man davon ausgehen, dass die Sonde in der Plasmamembran in Cholesterol-reiche Domänen eingebaut wurde. Da die Photokopplung sehr schnell geschieht, muss diese Domäne schon vor der Belichtung existiert haben. Dieser Befund steht im Einklang mit der für C<sub>5</sub>-TPD-Glucosylthioceramid (C<sub>5</sub>-TPD-Glc-S-Cer) beobachteten Photokopplung der Plasmamembranlipide. Hier wurden Verhältnisse der Kopplungspartner von C<sub>5</sub>-TPD-Glc-S-Cer (Cholesterol:PC:SM) von ca. 11,6 : 2,1 : 1 beobachtet. Außerdem bestätigt

es die elektronenmikroskopischen Beobachtungen, nach denen Biotin-GM1 nach Einbau in die Plasmamembran in ca. 100nm großen Clustern lokalisiert wurde (siehe Kapitel 3.3).

Wie es bereits für Referenzliposomen gezeigt werden konnte, koppeln die kurzkettigen Derivate der Photosonden nach Einbau in die Plasmamembran und nach Belichten zu einem überwiegenden Anteil mit Wasser. Ein beträchtlicher Teil dieser Wasserinsertionsprodukte entstammt wie beschrieben durch die Möglichkeit der kurzkettigen Sonden, sich aus der Ebene der Membran in die wässrige Umgebung zu lösen („off-rate/hopping-Bewegung“). Ebenso wird aber auch ein gewisser Anteil durch Kopplung mit in der Membran eingelagertem Wasser entstanden sein.

Die Verbindungen, die durch Wasserinsertion entstanden sind und das durch unvollständige Photolyse umgelagerte Diazoderivat sollten auf Grund ihrer nur lockeren Bindung leicht mit BSA aus der Plasmamembran re-extrahierbar sein („back-exchange“). Dazu wurden die Zellen nach Belichtung dreimal mit 100  $\mu\text{M}$  BSA in HMEM bei 4°C gewaschen. Das erhaltene „back-exchange“-Medium kann anschließend weiter aufgearbeitet und über DC charakterisiert werden. Behandelt man also die Zellen mit BSA, sollten die Photokopplungsprodukte mit Wasser, das Diazoisomer, sowie nicht umgesetztes C<sub>5</sub>-TPD-GM1 entfernt werden. Die an Membranlipide durch Photokopplung kovalent gebundenen Derivate sollten nur durch Extraktion mittels organischer Lösungsmittel zu isolieren sein.

Abbildung 3-24 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm von Extrakten humaner Fibroblasten nach einer Plasmamembran-Markierung, sowie die Bestandteile des „back-exchange“-Mediums.



**Abbildung 3-24:** Dünnschichtchromatogramm von Extrakten humanen Fibroblasten nach einer Plasmamembran-Markierung von mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1. Die Zellen wurden 90 min bei 4°C mit einer 10 µM-Lösung der Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) inkubiert; anschließend erfolgten ein Medienwechsel und die Belichtung. Danach wurde ein „back-exchange“ (BE) der kurzkettigen Verbindungen (dreimal für je 10 min mit 2 ml 100 µM BSA in HMEM bei 4°C) durchgeführt. (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 50:50:10 (v/v/v).)

Bahn 1: Unbelichtete C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde

Bahn 2: Zellextrakt

Bahn 3: „back-exchange“-Medium

Bahn 2 zeigt eine Extraktion mittels organischer Lösungsmittel aus der Plasmamembran nach 90 Minuten. Man erkennt die Kopplungsprodukte von Cholesterol, PC und Sphingomyelin neben der Wasserinsertion und dem umgelagerten Diazoisomer. Nach Behandlung mit BSA zeigt Bahn 3, wie erwartet, nur die Kopplungsprodukte der Wasserinsertion und das Diazoisomer. Die an Membranlipide durch Photokopplung gebundenen Moleküle konnten nicht mit BSA extrahiert werden bzw. liegen diese Extrakte unter der Nachweisgrenze.

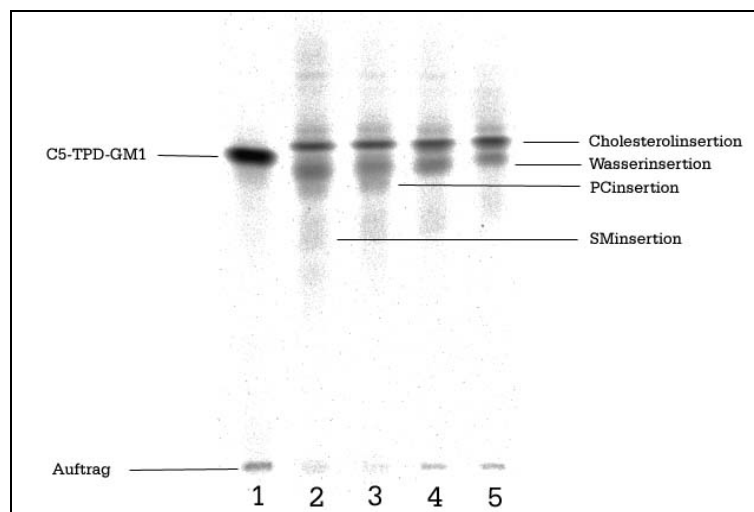
### 3.5.1.2 Ändert sich die Lipidumgebung von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 im Zuge der Endozytose?

In diesem Kapitel wird die Frage behandelt, ob und wie sich die Lipidumgebung der Sonden im Zuge der Endozytose verändert. Dazu wurde die C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Photosonde als 1:1-Lipid/BSA-Komplex an humane Fibroblasten gefüttert, und die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Endozytose belichtet und ihre Lipide

extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden im Anschluss dünn-schichtchromatographisch untersucht. Als Zeitfenster wurden Inkubationszeiten von 2, 4, 8, 15, 30, 60 und 120 Minuten unter Lichtausschluss bei 37°C gewählt.

Zu beachten ist hierbei, dass es zu Beginn der Endozytose (2, 4 und 8 Minuten-Werte) noch gewisse Schwankungen in den erhaltenen Messergebnissen geben kann. Diese sind eventuell auf die schnellen Aufwärm- und Abkühlphasen der Zellschalen zurückzuführen, die nötig waren, um so kurze Endozytosezeiträume darzustellen. Allerdings zeigt die Gesamtauswertung auch, dass diese Schwankungen für den allgemeinen Trend der Steigung bzw. Erniedrigung der Insertionswerte kaum von Belang waren.

In Abbildung 3-25 und 3-26 erkennt man wieder die typischen Kopplungsmuster der Photosonde mit Cholesterol, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin. Als Beispiel seien hier die Chromatogramme der 2' und 15'-Inkubationen gezeigt.



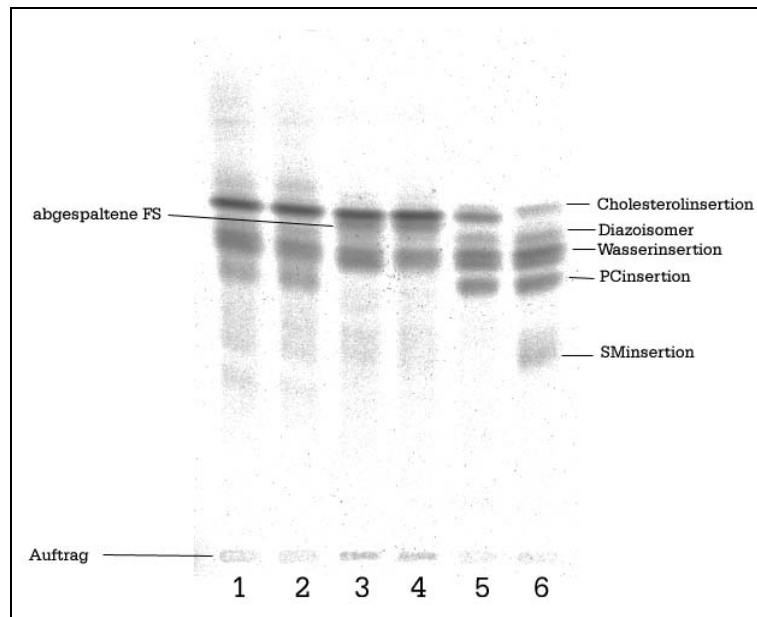
**Abbildung 3-25:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von humanen Fibroblasten. 90 Minuten Inkubation mit 10  $\mu$ M C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 4°C, Medienwechsel und 2 Minuten-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss. Anschließend „back-exchange“ der in die PM inserierten Moleküle und Belichtung.

Bahn 1: unbelichtetes C<sub>5</sub>-TPD-GM1

Bahn 2&3: Zellextrakt

Bahn 4&5: Zellextrakt nach alkalischer Hydrolyse

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:40:9 (v/v/v)



**Abbildung 3-26:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von humanen Fibroblasten. 90 Minuten Inkubation von  $10\ \mu\text{M}$   $\text{C}_5$ -TPD-GM1-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei  $4^\circ\text{C}$ , Medienwechsel und 15 Minuten-Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss. Anschließend „back-exchange“ der in die PM inserierten Moleküle und Belichtung.

Bahn 1&2: Zellextrakt

Bahn 3&4: Zellextrakt nach alkalischer Hydrolyse

Bahn 5: Referenzliposomen Cholesterol/DOPC/Sonde – 30:68:2 (mol-%)

Bahn 6: Referenzliposomen Cholesterol/DOPC/SM/Sonde – 30:38:30:2 (mol-%)

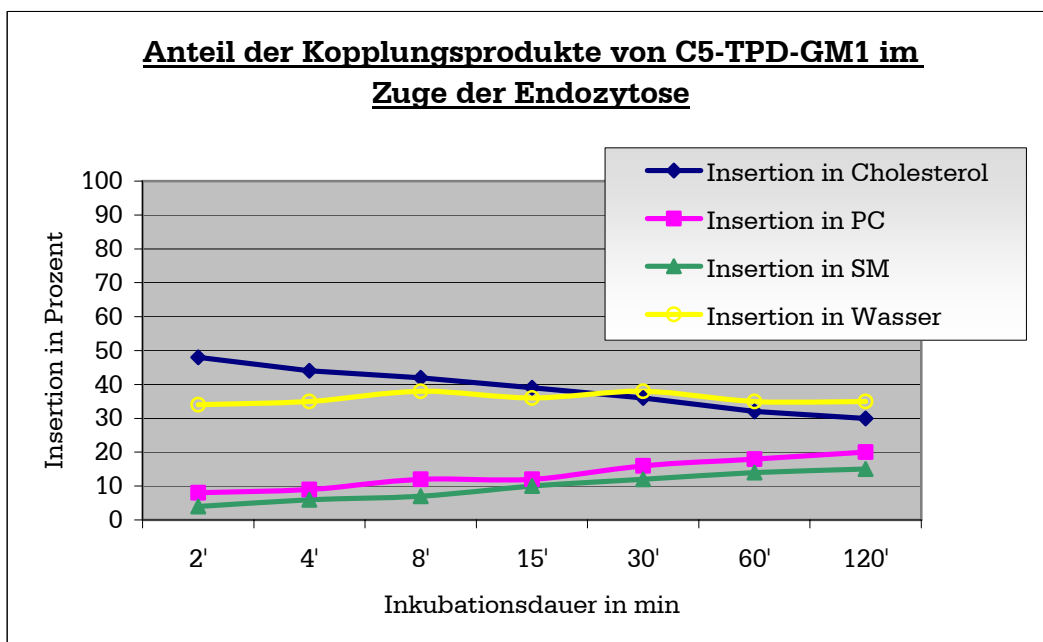
Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 50:50:10 (v/v/v)

Die Quantifizierung der einzelnen Banden ergab für die verschiedenen Zeiträume, dass die Insertion in Cholesterol trotz relativ kurzer Endozytosedauer im Vergleich zu den zuvor beschriebenen PM-Experimenten verhältnismäßig stark reduziert ist. Dahingegen zeigen die anderen Banden, die durch Insertion in PC oder SM herrühren, eine deutliche Zunahme.

Insertionsprodukt	2'	4'	8'	15'	30'	60'	120'
Cholesterol	48 ± 1,5	44 ± 0,5	42 ± 0,5	39 ± 1,0	36 ± 0,5	32 ± 2,0	30 ± 1,5
PC	8 ± 0,5	9 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 1,5	16 ± 1,0	18 ± 0,5	20 ± 1,0
SM	4 ± 1,0	6 ± 1,0	7 ± 0,5	10 ± 1,0	12 ± 1,5	14 ± 1,5	15 ± 1,0
Wasser	34 ± 2,0	35 ± 0,5	38 ± 1,0	36 ± 1,0	38 ± 2,5	35 ± 1,5	35 ± 2,5

**Tabelle 3-9:** Anteil der Insertionsprodukte in % von Zellextrakten von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 an humanen Fibroblasten nach 90 Minuten Inkubation mit 10 μM Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 4°C, Medienwechsel und anschließender Inkubation von der angegebenen Minutenzahl bei 37°C unter Lichtausschluss. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung.

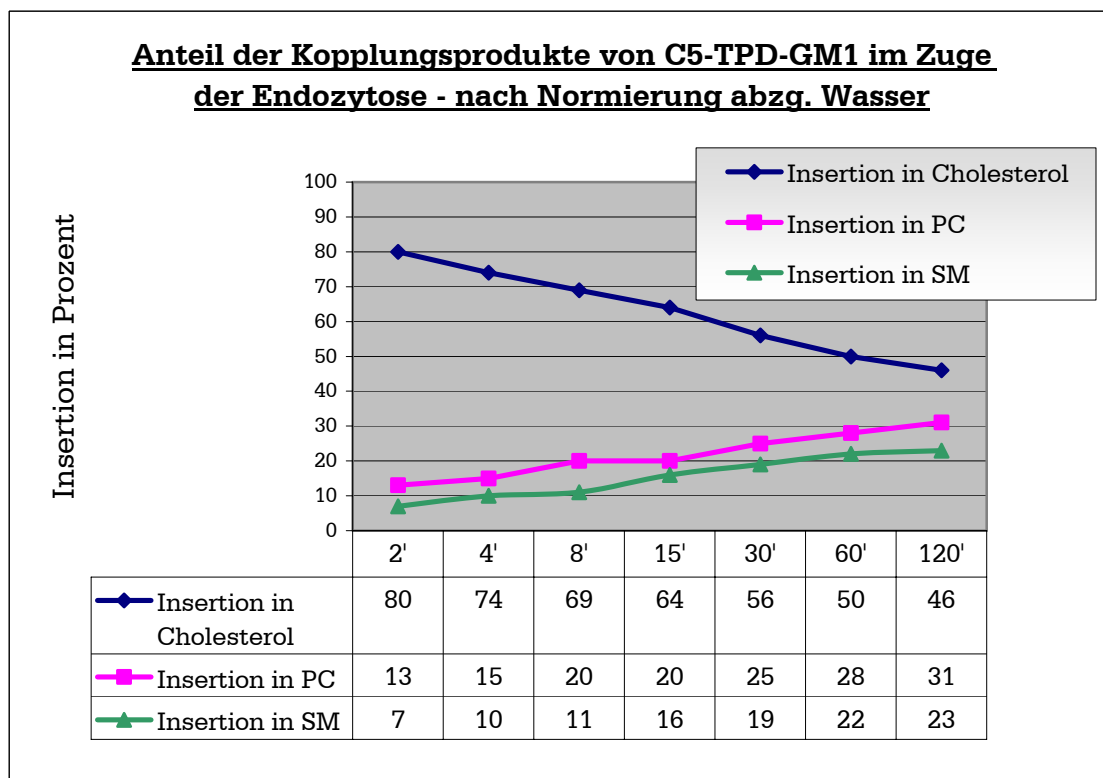
Diagramm 3-4 zeigt eine graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 3-9:



**Diagramm 3-4:** Graphische Darstellung der Insertionsprodukte C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in % von Zellextrakten von humanen Fibroblasten.

Man erkennt eine deutliche Änderung der Nachbarschaft der Photosonde bereits im frühen Verlauf der Endozytose. Dies spricht für ein Herauslösen der Sonden aus den Cholesterol-reichen Domänen. Möglicherweise kommt es sogar schon bei der Vesikelknospung aus der Plasmamembran oder in den frühen Endosomen zu dieser Umverteilung.

Noch deutlicher wird der Effekt nach Normierung, d.h. ohne Betrachtung der Produkte, die durch Wasserinsertion bzw. Umlagerung der Diaziringsgruppe (Diazoisomer) entstehen (Diagramm 3-5).



**Diagramm 3-5:** Anteil in % der Insertionsprodukte von Zellextrakten von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 an humanen Fibroblasten im Zuge der Endozytose.

Es wird deutlich, dass sich bereits nach kurzer Endozytosedauer die Zusammensetzung der Lipidnachbarschaft der C5-GM1-Photosonde ändert. 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 oder SM herrühren, verstärkt zu detektieren sind. So nimmt die Insertion in Cholesterol innerhalb von 15 Minuten schon um ein Fünftel ab. Nach zweistündiger Inkubation hat sich der Anteil der Kopplungsprodukte mit Cholesterol annähernd halbiert. Die Anteile der



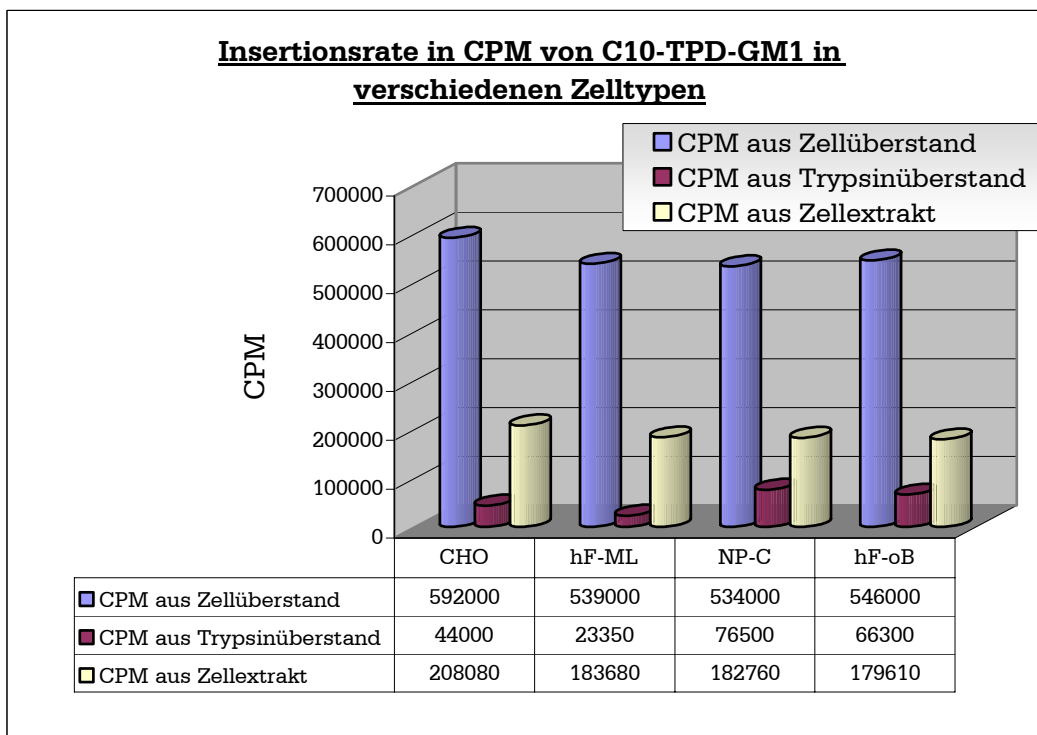
Photoinsertionen in PC und SM verdreifachen sich annähernd. Dieses verdeutlicht die bereits in Diagramm 3-4 gezeigte Tendenz, dass sich die Photosonde im Laufe der Endozytose aus den Mikrodomänen herauslöst.

### ***3.5.2 Untersuchungen zur Photokopplung der C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonde mit Lipiden in inneren Membranen verschiedener Zelltypen***

Wie bereits erwähnt und gezeigt, diffundieren Ganglioside mit Acylketten von C-18 nicht aus inneren Membranen heraus. Da C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in etwa einem GM1 mit einem Palmitinsäurerest im Ceramidteil entspricht, kann man bei genügend langer Inkubationsdauer erwarten, dass es sich in Lysosomen anreichert und man auch einen guten Einblick in die Lipidzusammensetzung der Membranen von MVBs bekommt.

Im Gegensatz zu der kurzkettigen C<sub>5</sub>-Photosonde kann C<sub>10</sub>-TPD-GM1 den Zellen nicht über einen Lipid:BSA-Komplex angeboten werden. Daher muss den Zellen das C<sub>10</sub>-TPD-GM1 exogen aus Mizellen angeboten werden. Dies bedingt, dass man nicht unter Temperaturblock der Endozytose arbeiten kann, da hierbei keine oder nur sehr wenige Moleküle der Photosonde in die Plasmamembran wechseln.

Selbst bei 37°C inseriert nur ein Bruchteil von Photosonden in die Plasmamembran im Vergleich zu den Einbauraten bei C<sub>5</sub>-TPD-GM1, wie Diagramm 3-5 zeigt:



**Diagramm 3-5:** Einbaurate (in CPM) von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 bei 37°C in verschiedene Zelltypen. Die Inkubationsdauer betrug 36h und eingesetzt wurden 20 nmol Lipid in DMEM pro Zellschale. Nach der Inkubation wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden trypsinisiert. Danach erfolgte die Belichtung und ein erneuter Mediumwechsel zur Zellernte. Es wurden jeweils Aliquots aus dem Zellüberstand vor Trypsinierung, aus dem Trypsinmedium und aus dem Extrakt nach Zellernte entnommen. Die Angaben sind auf mg Protein normiert.

**Bezeichnung der Zelltypen:**

CHO Chinese Hamster Ovary Cells  
 hF-ML humane Fibroblasten von Patienten mit Morbus Landing-Erkrankung  
 NP-C humane Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick Typ C-Erkrankung  
 hF-oB humane Fibroblasten normaler Probanden

In Spalte 1 werden die Werte der Extrakte der verschiedenen Medien aus Zellen von Chinese Hamster Ovaries aufgeführt. Diese Zellen sind ohne pathogenen Befund. Die anderen 3 Spalten sind humane Fibroblasten (hF). In Spalte 2 sind Zellen von Patienten mit dem Krankheitsbild *Morbus Landing* gezeigt. In diesen ist der Abbau von GM1 zu GM2 durch GM1-β-Galaktosidase defekt. Hier sollte also kein Abbau der Sonden erfolgen. Die nach Inkubation und Belichtung erhaltenen Kopplungsprodukte sollten also nur aus den intakten Sondenmolekülen in Membranen entstanden sein und nicht aus deren Abbauprodukten. Diese kann man nun mit den Kopplungsmustern der dünnschichtchromatographischen Trennung bei den anderen Zelltypen vergleichen. Finden sich Kopplungsprodukte mit identischem R<sub>f</sub>-Wert, so kann man davon ausgehen, dass diese ebenfalls nicht aus Abbauprodukten folgen, sondern aus Photokopplungen der intakten Sonde mit Membranlipiden entstammen. Die dritte Spalte zeigt die Extrakte aus Zellen mit der Niemann-Pick Typ C'schen

(NP-C) Erkrankung. In diesen führt ein Defekt des *NPC1*-Gen zur massiven Speicherung von Cholesterol in zytosolischen Vakuolen, die lysosomale Marker enthalten (späte Endosomen, Lysosomen und/oder lamellare Körperchen, die aus solchen Organellen entstehen). Die letzte Gruppe sind Werte aus humanen Fibroblasten normaler Probanden (hF-oB).

Man sieht, dass in allen 4 Zelltypen in etwa gleichviel GM1-Sonde in die Zellen gelangt. Lediglich in den CHO-Zellen wurden ca. 15 % mehr Lipid inseriert, was auf eine vermehrte Zellzahl zurückzuführen ist, und damit auch auf eine dichtere Substratbesetzung und eine höhere Membrandichte. Jedoch wurde ein Grossteil der angebotenen Sonde vor der Trypsinierung mit dem Inkubationsmedium wieder abgenommen, d.h. nur ca. 40 % von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 gelangten in die Zellmembran bzw. haften als Mizellen an der Membran. Dieser anhaftende Teil sollte durch die Behandlung mit Trypsin entfernt werden, so dass nur die in die Plasmamembran inserierten Photosonden zurückbleiben. Auch haftet ein erheblicher Anteil an den Gefäßwänden der Zellkulturschalen, der ebenfalls in diesen 40 % enthalten ist, aber für die Zellen nicht als Substrat zur Verfügung steht. In früheren Arbeiten<sup>1</sup> konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Teil (2-5 %) langkettiger Ganglioside aus Mizellen in Plasmamembranen inseriert werden können. In Tabelle 3-10 werden die Anteile der GM1-Photosonde in den verschiedenen Überständen und Extrakten aufgeführt.

<b>Anteil der C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Photosonde aus den verschiedenen Medien (prozentual und absolut in nmol)</b>						
<b>Zelltyp</b>	<b>Zellüberstand</b>		<b>Trypsinüberstand</b>		<b>Zellextrakt</b>	
	<b>%</b>	<b>nmol</b>	<b>%</b>	<b>nmol</b>	<b>%</b>	<b>nmol</b>
CHO	<b>59,2±2,6</b>	11,84	<b>4,4±1,1</b>	0,88	<b>20,8±1,3</b>	1,81
hF-ML	<b>53,9±1,8</b>	10,78	<b>2,3±0,8</b>	0,46	<b>18,4±1,5</b>	1,60
NP-C	<b>53,4±4,3</b>	10,68	<b>7,7±0,7</b>	1,54	<b>18,3±1,5</b>	1,59
hF-oB	<b>54,6±2,3</b>	10,92	<b>6,6±1,0</b>	1,32	<b>17,9±0,8</b>	1,56

**Tabelle 3-10:** Anteil von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den Extrakten der Medien nach verschiedenen Arbeitsschritten. Die Zellen wurden mit 20 nmol Sonde in DMEM für 36h bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgte Medienwechsel und Trypsinierung. Nach Belichtung erfolgte die Zellekte. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung.

<sup>1</sup> Callies, R. et al. (1977), Eur. J. Biochem.

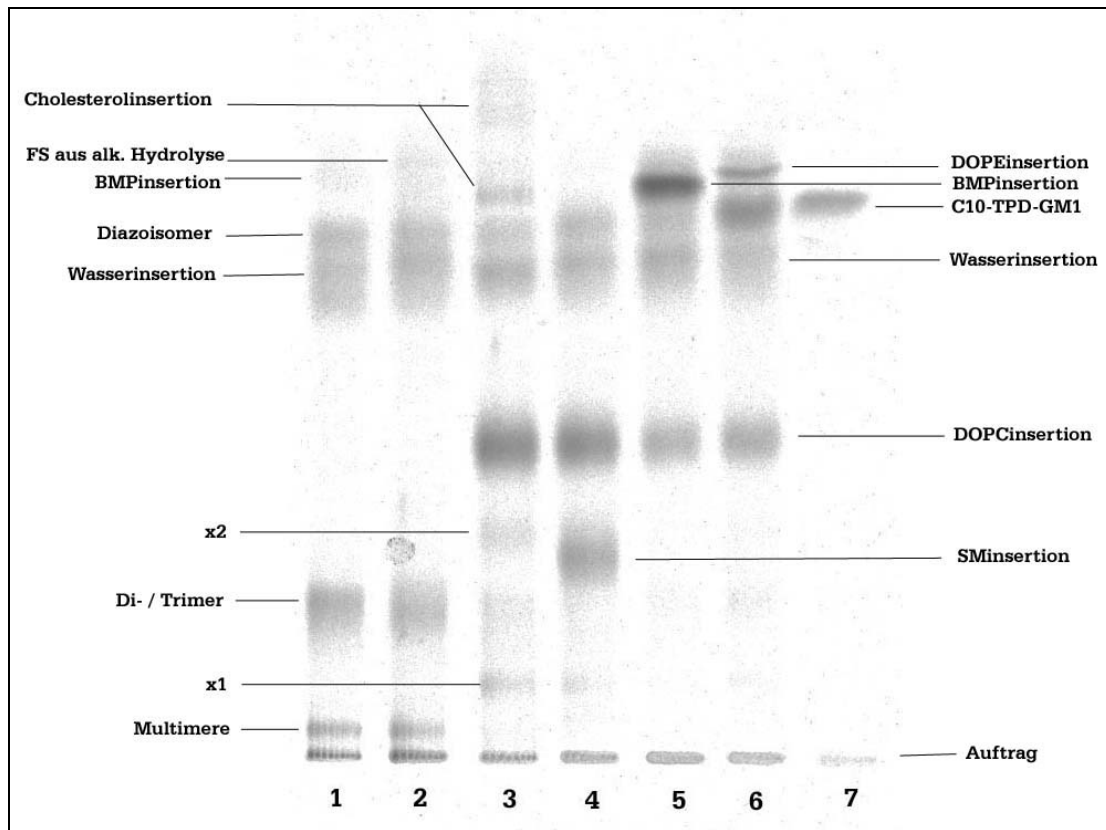
Deutlich wird, dass lediglich 2,3 – 7,7 % der Photosonde durch Trypsinierung wieder abgelöst wurden. Dies steht im Widerspruch zu dem erwarteten Ergebnis, dass der größte Teil der Photosonde durch diese Behandlung hätte entfernt werden sollen. Wenn man davon ausgeht, dass nur 2-5 % von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in die Plasmamembran inseriert hat, befindet sich der Rest immer noch in mizellarer Form an der Plasmamembranoberfläche. Jedoch wurde, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, auf eine extremere Behandlung der Zellen mit Trypsin verzichtet. Dies führte natürlich, wie man in den folgenden Zellversuchen sieht (Kapitel 3.5.1.3 – 3.5.1.6) zu einer Erhöhung der Anteile der Pauci- und Multimeren Kopplungsprodukte. Außerdem erhöht sich ebenfalls der Anteil des Wasserinsertionsproduktes, da zum einen in den Mizellen ein höherer Anteil an Wasser vorhanden ist als in der Plasmamembran, und zum anderen die „off-rate“ der langkettigen Photosonden aus Mizellen höher ist als aus Membranen.

Da jedoch eine Normierung der gefundenen Anteile erfolgt (d.h. eine Betrachtung der Produkte, ohne solche, die durch Wasserinsertion bzw. Umlagerung der Diaziringeruppe (Diazoisomer) entstehen), spielen diese Kopplungsprodukte für die Auswertung der Anteile der Lipidkopplungsprodukte keine Rolle.

### **3.5.2.1 Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten normaler Probanden**

Als erstes sollten die Kopplungsprodukte der C10-GM1-Sonde in humanen Fibroblasten normaler Probanden untersucht werden. Es wurden jeweils 20 nmol Photosonde pro Zellschale eingesetzt und 36h bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ebenfalls im Dunklen mit einer Lösung aus EDTA/Trypsin in DMEM behandelt. Dadurch sollten anhaftende Mizellen oder nicht vollständig in die Plasmamembran inserierte Moleküle entfernt werden. Nach der Belichtung erfolgte ein erneuter Medienwechsel und Zellernte.

Abbildung 3-27 zeigt die Lipidextrakte aus humanen Fibroblasten normaler Probanden, sowie Kopplungsprodukte aus Modellmembranen (die prozentuale Zusammensetzung ist in der Legende angegeben).



**Abbildung 3-27:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von humanen Fibroblasten 36h Inkubation mit 20nmol  $C_{10}$ -TPD-GM1-Sonde in DMEM bei 37°C, Medienwechsel und Trypsinierung unter Lichtausschluss. Anschließend Belichtung und Zellextraktion. (Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM  $CaCl_2$ /100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v))

Bahn 1: Zellextrakt aus humanen Fibroblasten

Bahn 2: Zellextrakt nach alkalischer Hydrolyse

Bahn 3: Referenzliposomen DOPC/Cholesterin/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 4: Referenzliposomen DOPC/SM/Sonde – 65:30:5 (mol-%)

Bahn 5: Referenzliposomen DOPC/BMP/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 6: Referenzliposomen DOPC/DOPE/Sonde – 47,5:47,5:5 (mol-%)

Bahn 7: unbelichtetes  $C_{10}$ -TPD-GM1

In den Bahnen 1 und 2 erkennt man im DC nur wenige Kopplungsprodukte. Hauptsächlich sind breite Banden von mehrfach Kopplungsprodukten mit niedrigem  $R_f$ -Wert entstanden. Außerdem finden sich noch das Diazoisomer und die Wasserinsersion als deutliche Banden. Ganz schwach ist oberhalb der Diazoisomer-Bande noch eine weitere Bande zu erkennen. Dass es sich hierbei um ein BMP-Kopplungsprodukt handeln könnte, zeigt die alkalische Hydrolyse. BMP sollte durch diese gespalten werden. Da jedoch die Esterbindungen im BMP, wie auch in anderen Zellversuchen bestätigt wurde, teilweise Hydrolyse-beständig sind, bleibt unter

diesen Bedingungen immer noch eine Spur ungespaltenes BMP zurück.<sup>1</sup> Dieser Befund konnte durch MALDI-TOF-MS bestätigt werden (die gefundenen Werte entsprechen denen aus Tabelle 3-7 Kapitel 3.4.2.5).

In Bahn 2 erkennt man jedoch eine durch die alkalische Hydrolyse neu entstandene Bande. Diese zeigt die abgespaltenen Fettsäuren der Lipide, welche mit einer GM1-Sonde gekoppelt waren.

Es lassen sich nur wenige Kopplungsprodukte von PC, SM oder Cholesterol entdecken. Diese Banden sind so schwach, dass sie nur in sehr starker Kontrastierung des DC sichtbar sind.

Die Werte für diese Banden finden sich zusammen mit den „sichtbaren“ in der folgenden Tabelle 3-11:

<b><u>Anteile der gefundenen Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in humanen Fibroblasten</u></b>		
	<b>Anteil Kopplungsprodukt in %</b>	<b>Anteil Kopplungsprodukt in % - nach Normierung</b>
Cholesterol	≥0,1	≥1,0
PC	<b>1,9 ± 0,2</b>	31,5
SM	<b>1,4 ± 0,2</b>	22,5
BMP	<b>2,8 ± 0,5</b>	46,0
Diazoisomer	<b>10,3 ± 0,5</b>	-
Wasserinsertion	<b>11,0 ± 0,7</b>	-
Di-/Trimer	<b>25,2 ± 1,5</b>	-
Multimer	<b>9,1 ± 0,2</b>	-

**Tabelle 3-11:** Anteil der Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den Extrakten humaner Fibroblasten normaler Probanden nach 36h Inkubation bei 37°C. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung. Die Normierung auf 100% erfolgte anteilmäßig nach Abzug aller „Nicht-Lipid-Insertionen“ (d.h. Diazoisomer, Wasserinsertion und Di-/Tri-/Multimere).

Nach Normierung ist dann doch eine deutliche Verteilung der Kopplungsprodukte auszumachen. Während PC- und SM-Kopplungsprodukte mehr oder weniger gleichverteilt sind, ist die Insertion in BMP deutlich erhöht.

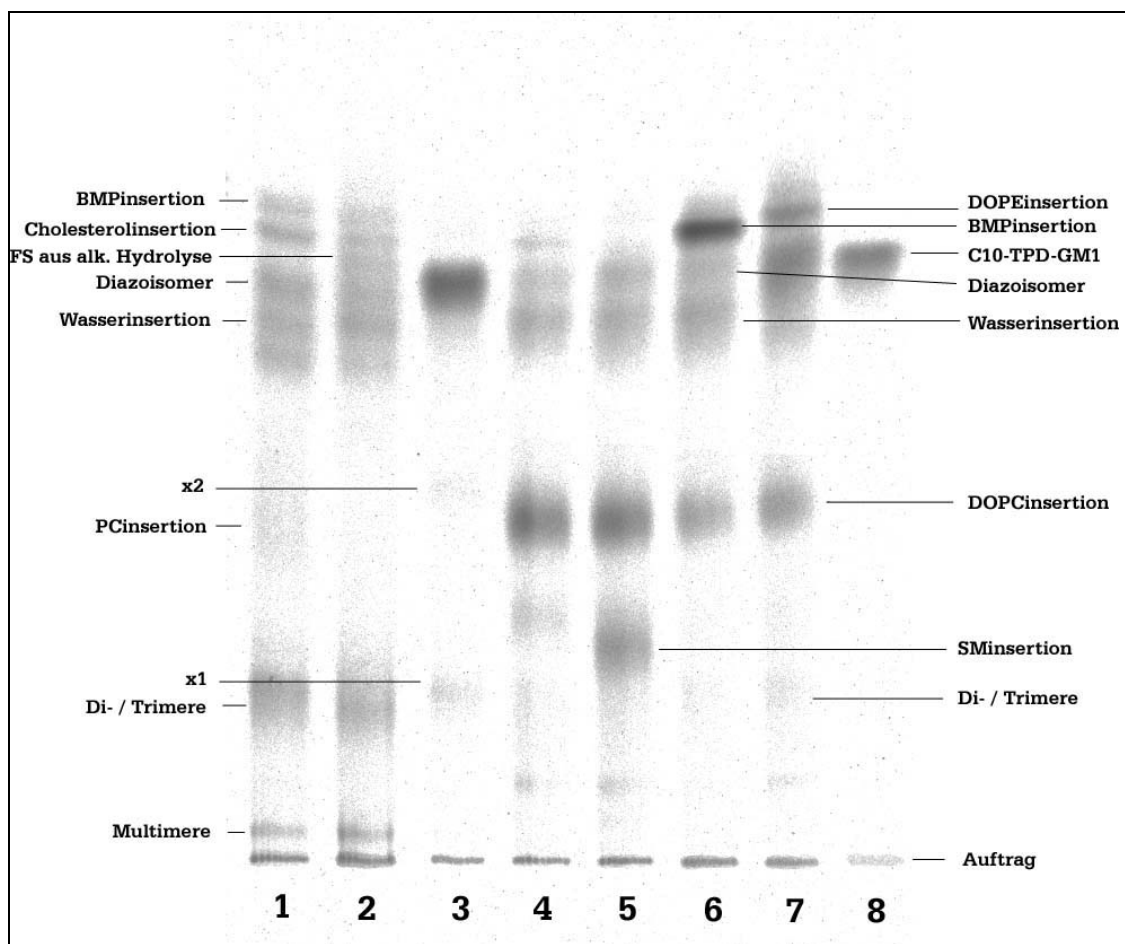
<sup>1</sup> Breiden, B. und Werth, N. (2003) persönliche Mitteilung

Die hohen Anteile von Pauci- und Multimeren sind auf eine nicht vollständige Trypsinierung der Zellen zurückzuführen. Ein weiterer Grund kann sein, dass neben den Photo-GM1-Sonden noch weitere Glykolipide in der Sondennachbarschaft vorliegen, die das Ergebnis verfälschen können. Dies mag bedeuten, dass die C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonden in Regionen intralysosomaler Vesikel inserieren, die reich an Glykolipiden sind. Dies würde ebenfalls einen Teil der Mehrfachkopplungen erklären. Die Charakterisierung der gefundenen Banden erfolgt (in diesem Versuch und auch den anderen Zelltypen) zum einen durch R<sub>f</sub>-Werte, welche denen aus Vergleichsliposomen aus Kapitel 3.4.2.4 entsprechen, sowie durch massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF. Auch diese Werte wurden bereits in Kapitel 3.4.2.5 aufgeführt.

Lediglich die Mehrfachkopplungen konnten nicht zweifelsfrei durch die Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Daher wurden diese Banden nur auf Grund ihrer R<sub>f</sub>-Werte zugeordnet.

### **3.5.2.2 Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in Membranen humaner Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick-Typ C-Erkrankung**

Als nächsten Zelltyp wurden humane Fibroblasten von Patienten mit der Niemann-Pick-Typ C'schen Erkrankung untersucht. Auf Grund der Speicherkrankheit sollte man hier einen größeren Anteil an Cholesterolinserktionen erwarten, da der Defekt des *NPC1*-Gen zur massiven Speicherung von Cholesterol in zytosolischen Vakuolen, die lysosomale Marker enthalten (wie z.B. späte Endosomen) führt.



**Abbildung 3-28:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von humanen Fibroblasten (typ NPC) nach 36h Inkubation mit 20nmol C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonde in DMEM bei 37°C, Medienwechsel und Trypsinierung unter Lichtausschluss. Anschließend Belichtung und Zellextraktion.

Bahn 1: Zellextrakt aus NPC-Zellen

Bahn 2: Zellextrakt aus NPC-Zellen nach alkalischer Hydrolyse

Bahn 3: Zellextrakt aus NPC-Zellen ohne Belichtung

Bahn 4: Referenzliposomen DOPC/Cholesterol/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 5: Referenzliposomen DOPC/SM/Sonde – 65:30:5 (mol-%)

Bahn 6: Referenzliposomen DOPC/BMP/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 7: Referenzliposomen DOPC/DOPE/Sonde – 47,5:47,5:5 (mol-%)

Bahn 8: unbelichtetes C<sub>10</sub>-TPD-GM1

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v)

Es finden sich deutliche Banden mit hohem R<sub>f</sub>-Wert, die Mehrfachkopplungsprodukte bzw. nicht-identifizierbare GSL-Kopplungen darstellen.

Auch hier ist der Hauptanteil dieser Kopplungen auf die nicht vollständige („schonende“) Trypsinierung der Zellen zurückzuführen. Wie erwartet, ist im Vergleich zu „Normalzellen“ eine höhere Cholesterolinserktion zu sehen (Vgl. Tabelle



3-12 und Tabelle 3-13). Bahn 2 zeigt die Extrakte nach alkalischer Hydrolyse. Wie auch bei humanen Fibroblasten normaler Probanden findet man hier gegenüber Bahn 1 eine zusätzliche Bande, welche die durch alkalische Hydrolyse abgespaltenen Fettsäuren mit gekoppelter Sonde darstellt. In Bahn 3 wurden Extrakte aus unbelichteten NPC-Zellen aufgetragen. Hier wurde erwartet, dass man nur C<sub>10</sub>-TPD-GM1 wiederfindet und keine zusätzlichen Photokopplungsprodukte. Allenfalls sollten Produkte aus dem Stoffwechsel der intakten Photosonde auftreten. In Abbildung 3-27 sieht man außer der Bande von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 keine weiteren signifikanten Banden, so dass man davon ausgehen kann, dass das Derivat kaum verstoffwechselt wurde, sondern in unveränderter Form in den inneren Membranen vorliegt. Man sieht in Bahn 3 lediglich zwei schwache Banden (x1 & x2), die allerdings auf Grund der geringen Menge nicht massenspektrometrisch zu untersuchen waren.

<b><u>Anteile der gefundenen Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in humanen Fibroblasten des Typs NPC</u></b>		
	<b>Anteil Kopplungsprodukt in %</b>	<b>Anteil Kopplungsprodukt in % - nach Normierung</b>
Cholesterol	<b>7,3 ± 0,2</b>	44,2
PC	<b>3,3 ± 1,1</b>	20,0
SM	<b>1,7 ± 0,5</b>	10,3
BMP	<b>4,2 ± 0,3</b>	25,5
Diazoisomer	<b>10,8 ± 0,5</b>	-
Wasserinsertion	<b>10,6 ± 1,0</b>	-
Di-/Trimer	<b>15,9 ± 0,5</b>	-
Multimer	<b>3,2 ± 0,7</b>	-

**Tabelle 3-12:** Anteil der Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den Extrakten humaner Fibroblasten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung (Typ C) nach 36h Inkubation bei 37°C. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung. Die Normierung auf 100% erfolgte anteilmäßig nach Abzug aller „Nicht-Lipid-Insertionen“ (d.h. Diazoisomer, Wasserinsertion und Di-/Tri-/Multimere).

Auf Grund der Speicherung von Cholesterol in späten Endosomen<sup>1</sup> findet man aber einen hohen Anteil der Cholesterolinserktion, welcher auch das

<sup>1</sup> Garver, W.S. und Heidenreich, R.A. (2002), Curr. Mol. Med.

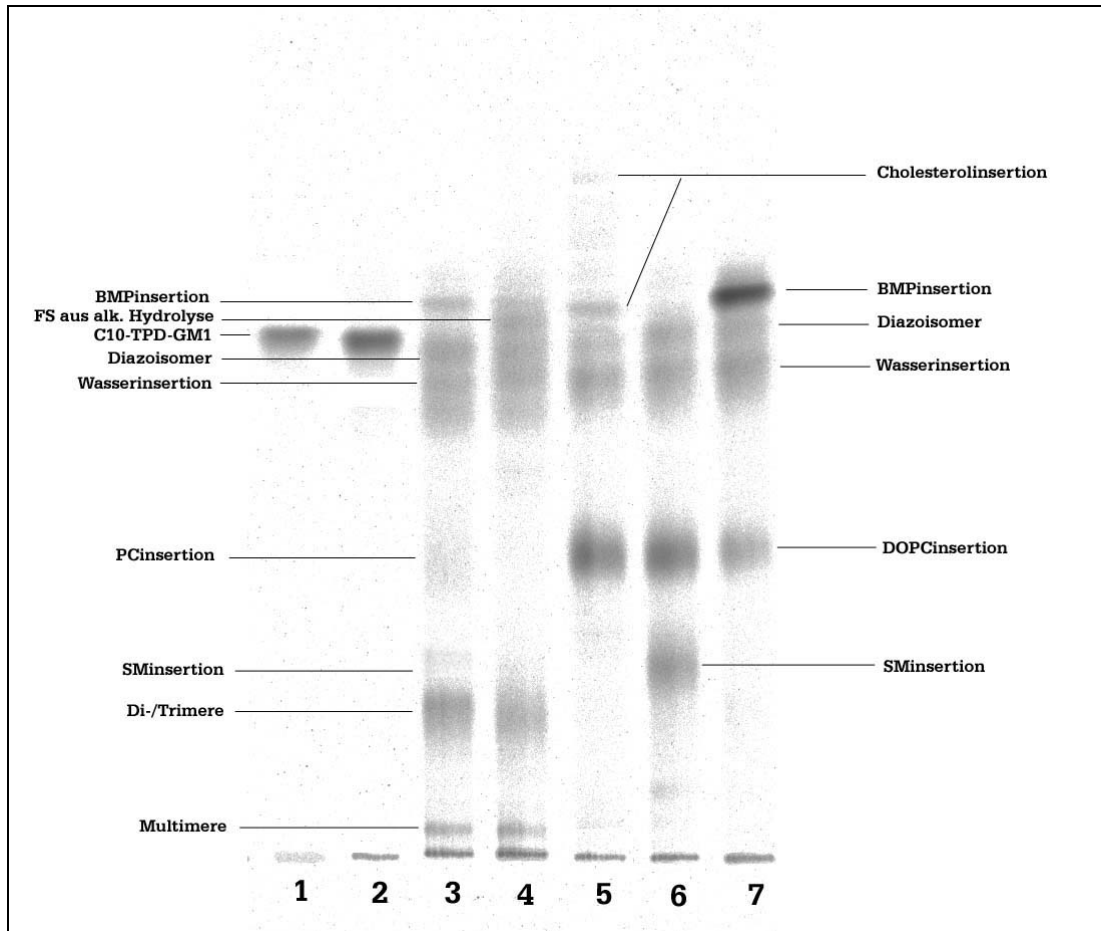
Hauptkopplungsprodukt darstellt. Ebenso ist aber auch ein hoher Anteil der Photokopplung mit BMP zu finden. Das Verhältnis zwischen PC-Insertion und SM-Insertion steigt im Vergleich zu dem in humanen Fibroblasten normaler Probanden gefundenen. War es vorher 3:2, erscheint es hier mit 2:1. Dies wird wohl in erster Linie aus Fehlern der analytischen Bestimmung herrühren. Da beide Kopplungsprodukte nur als diffuse Banden zu sehen sind, wird die Abgrenzung zur Quantifizierung eher ungenau, so dass hier schnell kleinere Abweichungen auftreten können.

### **3.5.2.3 Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in humanen Fibroblasten von Patienten mit Morbus-Landing-Erkrankung**

Im vorigen Abschnitt konnte durch Zellexperimente ohne Belichtung (der Photosonden) gezeigt werden, dass Stoffwechselprodukte im gewählten Zeitrahmen nicht in nennenswerten Mengen auftraten (Bahn 3 – Abbildung 3-27).

Durch Zellexperimente mit Zellen des Typs Morbus-Landing sollte dieser Befund bestätigt werden können. Dadurch, dass diese Zellen auf Grund einer Defizienz der GM1- $\beta$ -Galaktosidase die Sonde nicht spalten können, dürfen auch bei ausgedehnter Inkubation keine Abbauprodukte zu finden sein. Auch hier wurde wieder ein Experiment ohne Belichtung der TPD-GM1-Sonde durchgeführt, so dass man einen direkten Vergleich hat.

Abbildung 3-28 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte und der Kopplungsprodukte aus Modellmembranen.



**Abbildung 3-29:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von humanen Fibroblasten mit der Erkrankung Morbus-Landing nach 36h Inkubation mit 20nmol C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonde in DMEM bei 37°C, Medienwechsel und Trypsinierung unter Lichtausschluss. Anschließend Belichtung und Zellextraktion.

Bahn 1: unbelichtetes C<sub>10</sub>-TPD-GM1

Bahn 2: Zellextrakt aus hF-ML-Zellen ohne Belichtung

Bahn 3: Zellextrakt aus hF-ML-Zellen

Bahn 4: Zellextrakt aus hF-ML-Zellen nach alkalischer Hydrolyse

Bahn 5: Referenzliposomen DOPC/Cholesterol/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 6: Referenzliposomen DOPC/SM/Sonde – 65:30:5 (mol-%)

Bahn 7: Referenzliposomen DOPC/BMP/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v)

In Bahn 1 findet sich die unbelichtete Sonde, Bahn 2 zeigt Extrakte aus Zellen ohne Belichtung. Man erkennt, dass beide Bahnen nahezu identisch sind und in Bahn 2 keinerlei Stoffwechselprodukte zu finden sind. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Versuchen mit NPC-Zellen (siehe Kapitel 3.5.2.2). Bahn 3 zeigt die bekannten Banden der zu erwartenden Kopplungsprodukte. Auch hier bestätigt die alkalische Hydrolyse

die Zuordnung der Banden. Während die PC-Insertionsbande vollständig verschwindet, wird bei BMP nur ein Teil gespalten, während ein Rest zurück bleibt. Dafür findet man in dieser Bahn eine zusätzliche Bande, welche aus der Freisetzung der Fettsäuren von Esterlipiden entstammt. Die Kopplungsprodukte dieser Lipide mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 werden in der alkalischen Hydrolyse gespalten und setzen mit Photosonden gekoppelte Fettsäuren frei. Die Quantifizierung der Banden der Kopplungsprodukte ergibt wieder als Hauptprodukt der Kopplung TPD-GM1 mit BMP. Die Kopplung der Sonde mit PC und SM erscheint, wie auch bei NPC-Zellen im Verhältnis 3:1. Auch sinkt der Anteil der Cholesterolkopplungsprodukte im Vergleich zu NPC-Zellen um ca. 75%. Aus der Tabelle 3-13 erkennt man weiterhin, dass eine Inkubation größer 36h keine merkbare Auswirkung auf die Ausbeute der Kopplungsprodukte hat.

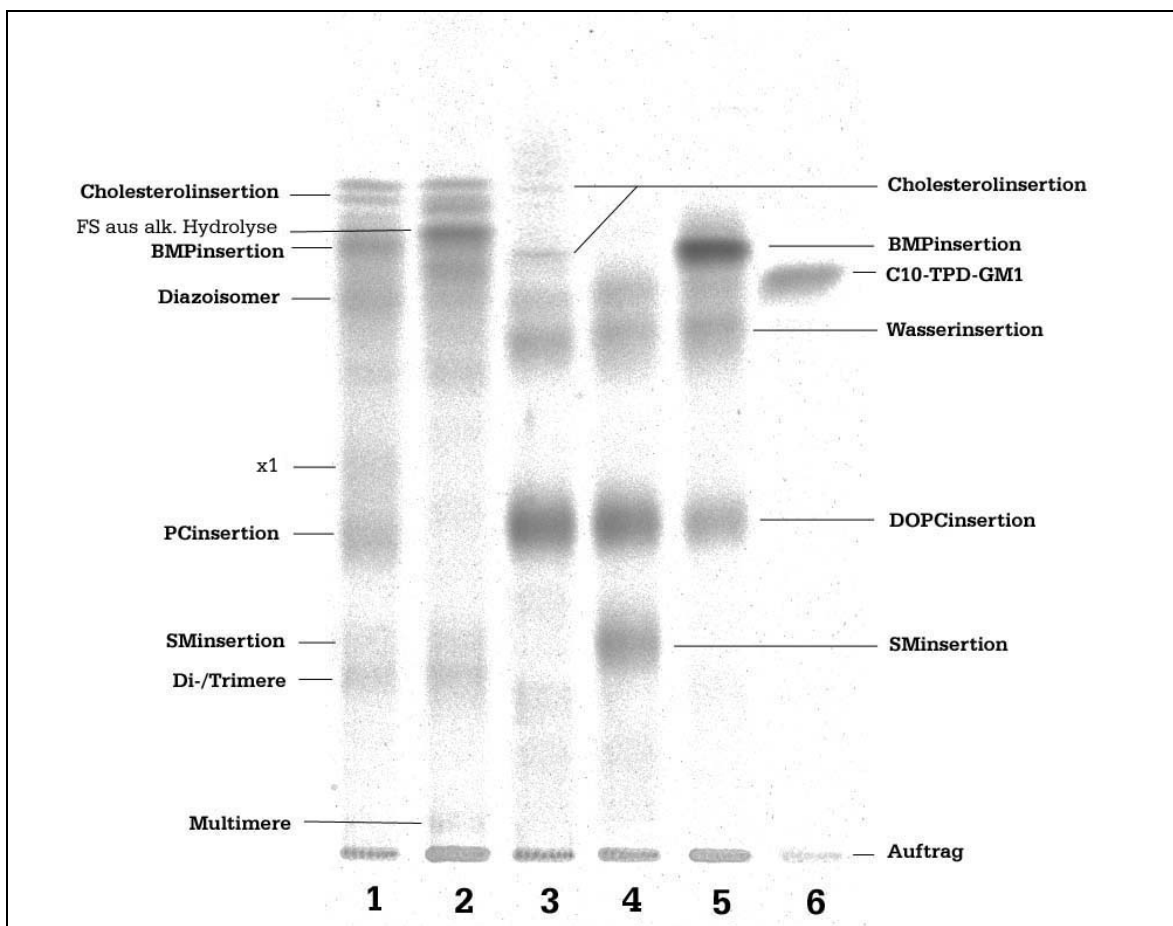
<b><u>Anteile der gefundenen Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in humanen Fibroblasten des Typs Morbus Landing</u></b>						
	<b>Anteil Kopplungsprodukte nach 36h in %</b>		<b>Anteil Kopplungsprodukte nach 48h in %</b>		<b>Anteil Kopplungsprodukte nach 72h in %</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Cholesterol	<b>0,9 ± 0,2</b>	8,5	<b>0,7 ± 0,2</b>	5,7	<b>0,8 ± 0,3</b>	6,6
PC	<b>3,5 ± 1,1</b>	31,5	<b>4,1 ± 0,5</b>	33,6	<b>4,3 ± 0,7</b>	35,5
SM	<b>1,3 ± 0,2</b>	11,9	<b>1,1 ± 0,2</b>	9,0	<b>1,0 ± 0,1</b>	8,3
BMP	<b>5,3 ± 0,7</b>	48,1	<b>6,3 ± 1,1</b>	51,6	<b>6,0 ± 1,0</b>	49,6
Diazoisomer	<b>12,4 ± 2,8</b>	-	<b>15,2 ± 1,3</b>	-	<b>13,4 ± 2,1</b>	-
Wasserinsertion	<b>11,3 ± 1,3</b>	-	<b>10,1 ± 0,5</b>	-	<b>14,3 ± 0,8</b>	-
Di-/Trimer	<b>18,3 ± 1,8</b>	-	<b>17,9 ± 1,9</b>	-	<b>20,2 ± 0,8</b>	-
Multimer	<b>4,3 ± 0,6</b>	-	<b>2,3 ± 0,6</b>	-	<b>3,7 ± 0,6</b>	-

**Tabelle 3-13:** Anteil der Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den Extrakten humaner Fibroblasten mit Morbus Landing Erkrankung nach 36, 48 und 72h Inkubation bei 37°C. Die Fehlergrenzen der Spalten A ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung. Die Normierung (Spalten B) auf 100% erfolgte anteilmäßig nach Abzug aller „Nicht-Lipid-Insertionen“ (d.h. Diazoisomer, Wasserinsertion und Di-/Tri-/Multimere).

### 3.5.2.4 Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in Membranen von „Chinese Hamster Ovary Cells“

CHO-Zellen haben im Vergleich zu humanen Fibroblasten einen signifikant höheren Anteil an BMP in inneren Membranen.<sup>i</sup> Daher konnte man hoffen, in diesem Zelltyp einen höheren Anteil an Kopplung von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 mit BMP zu erhalten und damit auch eine leichtere Detektion des Kopplungsproduktes in DC und MALDI-TOF-MS. Außerdem sollte dieser Versuch zeigen, ob sich das Lipidmuster im Vergleich zu humanen Zellen ändert oder den bisher gefundenen Ergebnissen entspricht.

In Abbildung 3-30 erkennt man, dass das Bandenmuster von den bisher gezeigten humanen Zelllinien ein wenig abweicht..



**Abbildung 3-30:** Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden von Zellen aus Chinese Hamster Ovaries nach 36h Inkubation mit 20nmol C<sub>10</sub>-TPD-GM1-Sonde in DMEM bei 37°C, Medienwechsel und Trypsinierung unter Lichtausschluss. Anschließend Belichtung und Zellextraktion. (Laufmittel: Chloroform/Methanol/30 mM CaCl<sub>2</sub>/100 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v))

Bahn 1: Zellextrakt aus CHO-Zellen

<sup>i</sup> Stoorvogel, . (2003) persönliche Mitteilung

Bahn 2: Zellextrakt aus CHO-Zellen nach alkalischer Hydrolyse

Bahn 3: Referenzliposomen DOPC/Cholesterol/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 4: Referenzliposomen DOPC/SM/Sonde – 65:30:5 (mol-%)

Bahn 5: Referenzliposomen DOPC/BMP/Sonde – 75:20:5 (mol-%)

Bahn 6: unbelichtetes C<sub>10</sub>-TPD-GM1

So sind deutlich Banden der Stereoisomere der Cholesterolinserktion mit hohem R<sub>f</sub>-Wert zu sehen. Daneben ist in Bahn 1 eine mit x1 bezeichnete Bande zu sehen. Diese Bande konnte jedoch aus Mangel von genügend Material nicht im MALDI-MS untersucht werden und entsprach auch keiner in Modellmembranen gefundenen Kopplung. Neben der Insertion in Cholesterol fallen auch die im Vergleich zu humanen Fibroblasten deutlich höheren Insertionen in PC und SM auf. Auch findet man, wie erwartet, ein hohen hohen Anteil an Kopplungsprodukt von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 mit BMP.

Die Quantifizierung der gefundenen Banden wird in Tabelle 3-14 zusammengefasst.

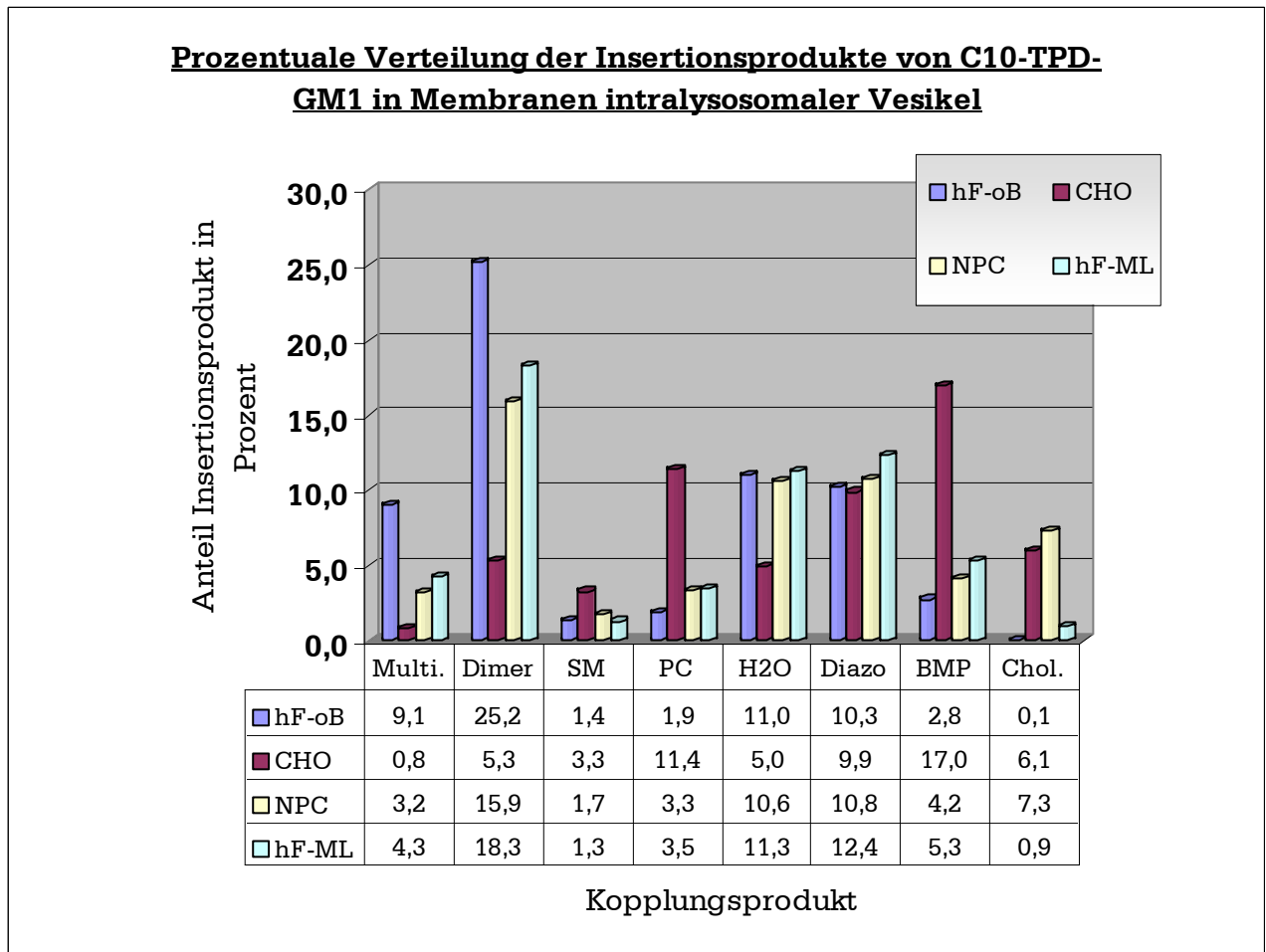
<b><u>Anteile der gefundenen Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in „Chinese Hamster Ovary Cells“</u></b>		
	<b>Anteil Kopplungsprodukt in %</b>	<b>Anteil Kopplungsprodukt in % - nach Normierung</b>
Cholesterol	<b>6,1 ± 0,4</b>	16,3
PC	<b>11,4 ± 0,2</b>	30,4
SM	<b>3,3 ± 0,4</b>	8,7
BMP	<b>17,0 ± 1,2</b>	44,7
Diazoisomer	<b>9,9 ± 0,5</b>	-
Wasserinsertion	<b>5,0 ± 0,6</b>	-
Di-/Trimer	<b>5,3 ± 1,0</b>	-
Multimer	<b>0,8 ± 0,3</b>	-

**Tabelle 3-14:** Anteil der Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den Extrakten „Chinese Hamster Ovary Cells“ nach 36h Inkubation bei 37°C. Die Fehlergrenzen ergeben sich aus den Werten der Dreifachbestimmung. Die Normierung auf 100% erfolgte anteilmäßig nach Abzug aller „Nicht-Lipid-Insertionen“ (d.h. Diazoisomer, Wasserinsertion und Di-/Tri-/Multimere).

Als Hauptprodukt der Kopplungspartner findet man, wie auch schon in Zellen humaner Patienten, die Kopplung mit BMP. Auch das Verhältnis PC-Insertion zu SM-

Kopplung findet sich mit 3:1 ähnlich wie in den humanen Zellen mit Morbus-Landing-Erkrankung und NPC-Erkrankung. Im Vergleich zu den humanen Fibroblasten zeigt sich jedoch eine deutliche prozentuale Erhöhung der Lipidkopplungsprodukte und auch der Cholesterinsertion. Dahingegen findet man erheblich weniger Kopplungsprodukte der Pauci- und Multimeren und auch weniger Wasserinsertion. Geht man davon aus, dass diese Kopplungsprodukte zum größten Teil aus Photosonden in Mizellen zustande kommen, die durch unvollständige Trypsinierung immer noch an den Zellen haften, folgt daraus, dass ein Großteil des Wasserinsertionsproduktes ebenfalls daher resultiert.

### 3.5.2.5 Graphische Darstellung und Zusammenfassung der Insertionsexperimente mit C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in den verschiedenen Zelltypen



**Diagramm 3-6:** Graphische Darstellung der Insertionsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in verschiedenen Zelllinien (Für Bezeichnung der Zelltypen siehe Diagramm 3-5). Gezeigt wird die prozentuale Verteilung bzgl. der Gesamtinsertionsmenge. Aufgeführt sind alle identifizierten Banden, Kopplungsprodukte, die nicht identifiziert werden konnten, sind aus der Betrachtung herausgenommen worden, liegen aber auch in ihrem Anteil weit unter 1-2%.

Fasst man die gefundenen Werte zusammen, fallen die hohen Werte von Multimeren bzw. Dimeren in humanen Fibroblasten auf. Wie in vorigen Kapiteln erläutert, folgt dieses hauptsächlich aus der unvollständigen Trypsinierung der Zellen. Diese wurde gewählt um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Auch mag dies damit zusammenhängen, dass auf intralysosomalen Membranen im Gegensatz zu Referenzliposomen Kopplungen mit anderen Glykolipiden auftreten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Sonde bevorzugt in bestimmte Bereiche dieser Membranen segregiert. Hier wäre dann eine erhöhte Konzentration der Sonde zu finden und damit auch ein erhöhter Anteil von multimeren Kopplungsprodukten nach Belichtung.

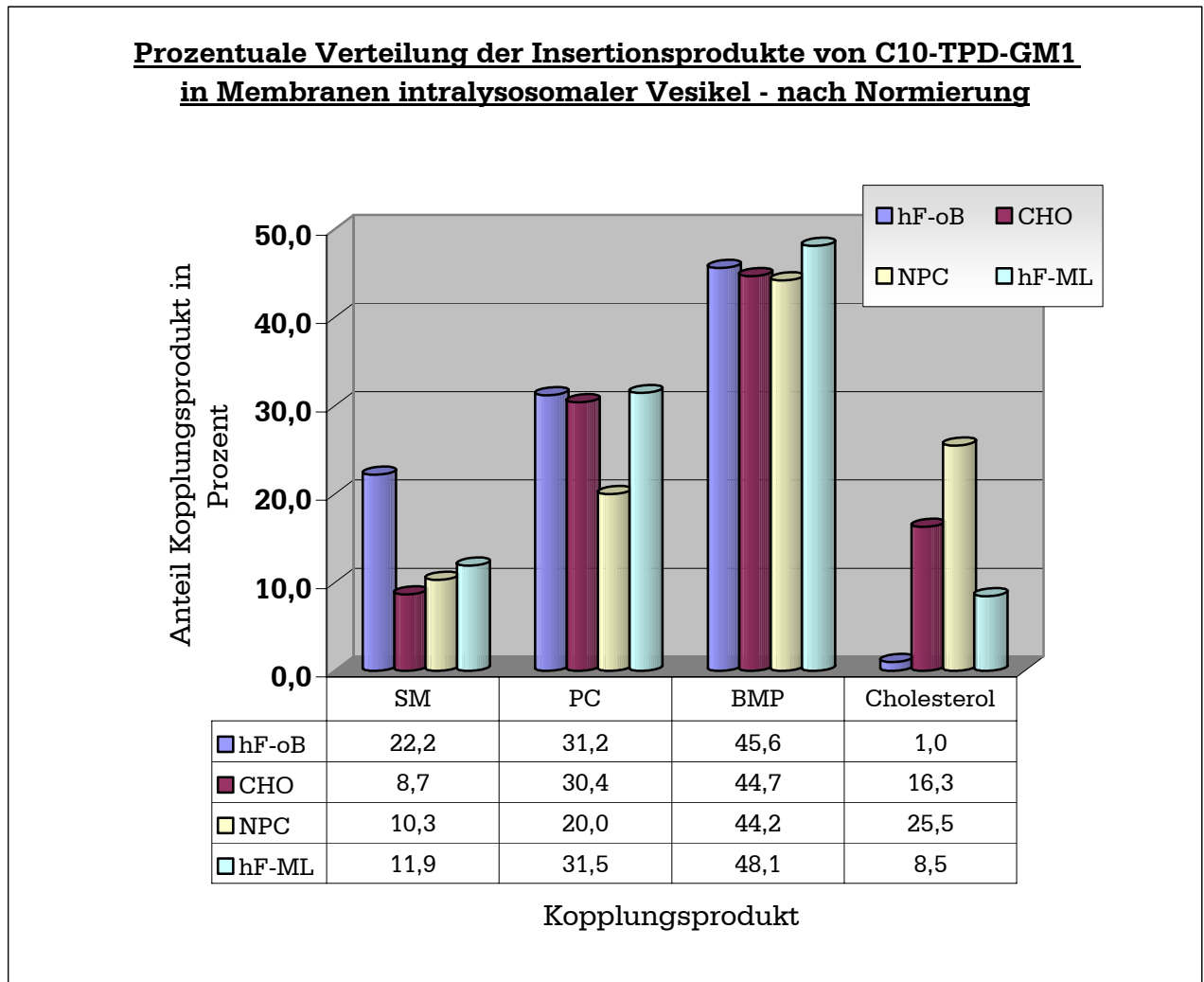
Lässt man die Kopplungen der Photosonden mit sich selber oder anderen Glykolipiden außen vor, stellt die Wasserinsertion (mit Ausnahme in CHO-Zellen) das Hauptkopplungsprodukt dar. Auch dieses lässt sich in diesen Größenordnungen auf die unvollständige Trypsinierung zurückführen. Die Umlagerung zum Diazoisomer bleibt in allen Zelltypen bei ca. 10 %.

Wegen der schonenden und damit unvollständigen Trypsinierung der Zellen sind hier die Kopplungsprodukte mit Cholesterol, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin in humanen Fibroblasten (mit und ohne pathologischen Befund) - gesehen auf die gesamte Radioaktivität - immer unter 5 %. Selbst in Zellen, die reich an Cholesterol sein sollten (NPC) wird dieser Wert nur knapp überschritten. Lediglich die Kopplung der Sonde mit Bis(monoacylglycero)phosphat ist in den beiden Zelltypen mit pathologischem Defekt größer als 5 %. Dies liegt daran, dass auf Grund der unvollständigen Trypsinierung der Hauptanteil der Kopplungsprodukte aus Pauci- und Multimeren besteht. Jedoch wird durch Normierung - d.h. ohne Betrachtung der Produkte, die durch Wasserinsertion bzw. Umlagerung der Diazirinegruppe (Diazoisomer) entstehen, sowie ohne Betrachtung der Photokopplungsprodukte der Mehrfachkopplungen – diese „Verschiebung“ der Werte ausgeglichen (siehe Diagramm 3-7). Hier sieht man, dass in allen Zelltypen das Hauptkopplungsprodukt aller Lipide die Insertion in BMP ist. Das zeigt, dass BMP häufig zumindest in der Nachbarschaft der Glykolipide zu finden ist.

Die Verteilung der anderen Lipidkopplungsprodukte lässt nicht allzu viele Schlüsse zu. Klar zu sehen ist, dass in NPC-Zellen der Cholesterolanteil stark erhöht ist. Auch erscheint Sphingomyelin immer als schwächster Kopplungspartner. Lediglich in humanen Fibroblasten normaler Probanden scheint der Anteil größer 20 % zu liegen.



Auffällig ist jedoch, dass in diesem Zelltyp kaum Kopplungsprodukt der Sonde mit Cholesterol gefunden werden konnte. Diese scheinbar geringere Insertion in Cholesterol ist erstaunlich und hier nicht erklärbar. Jedoch führt das Fehlen des Anteils an Cholesterolkopplungsprodukt in der Normierung zu einer Erhöhung der Werte der anderen Lipidkopplungsprodukte.



**Diagramm 3-7:** Graphische Darstellung der normierten Anteile der Kopplungsprodukte von Cholesterol, PC, BMP und SM. Diese 4 Moleküle stellen den Hauptanteil aller „lipidischen“ Kopplungsprodukte. Die Normierung erfolgte auf 100% abzgl. der Diazosomere, Wasserinsertion und Multimeren. Nicht mit einbezogen werden konnten Kopplungen mit anderen GSL, die evtl. in ihrem Laufverhalten dem der Multimeren entsprechen.

Für Bezeichnung der Zelltypen siehe Diagramm 3-5.

## 4 *Diskussion*

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, steht die Untersuchung der genauen Verteilung und Anordnung von Molekülen in biologischen Membranen seit Jahrzehnten im Blickfeld verschiedener Forschungsgruppen. In der Verfolgung der verschiedenen Ziele und Vorhaben wurden zu deren Verwirklichung eine Vielzahl von verschiedenen biochemischen und physikalischen Methoden entwickelt und angewendet. Einige davon wurden in dieser Arbeit benutzt und zum Teil weiterentwickelt. So wurde zur einfachen subzellulären Lokalisation von Lipiden und Glykolipiden die Einführung von Fluoreszenzsonden und anschließende Untersuchungen in Lichtmikroskopen durchgeführt. Das Auflösungsvermögen der Mikroskope begrenzt allerdings diese Methodik. Einzelne Moleküle oder kleinere Cluster können nicht erkannt werden, so dass hierzu andere Methoden angewendet werden müssen. Mit Hilfe der NBD-Sonden sollte lediglich visualisiert werden, dass in der Acylkette derivatisierte GM1 in die Plasmamembran inseriert werden können und im Zuge der Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Genauere Aussagen über die Lokalisation von Glykosphingolipiden können da eher durch elektronenmikroskopische Untersuchungen getroffen werden. Hier werden Antikörper zum Nachweis genutzt. So konnte durch Verwendung eines Biotinmarkierten Derivates des GM1 elektronenmikroskopisch die intrazelluläre Verteilung dieses Gangliosids gezeigt werden. Ein gravierender Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie nicht *in vivo* durchgeführt werden kann, da die Zellen vor dem Einbringen in das Elektronenmikroskop chemisch fixiert werden müssen. Ebenso kann hier nur sehr begrenzt etwas über die Umgebung der Moleküle ausgesagt werden, da für jede zu untersuchende Komponente spezifische Antikörper eingesetzt werden müssen. Um die direkte Nachbarschaft von Lipiden zu untersuchen und Information über alle in der Nachbarschaft der Sonden enthaltenen Bestandteile zu erlangen, wurden photoaktivierbare Lipide verwendet. Mit Hilfe dieser Derivate können sowohl in Modellmembranen (Liposomen), als auch in Membranen lebender Zellen ihre Lipidnachbarschaft charakterisiert werden. Weiterhin kann auf Grund der kurzen Belichtungszeit und ebenso schneller Reaktion des *in situ* entstehenden Carbens davon ausgegangen werden, dass durch die Photoinsertion zu jedem gewählten Zeitpunkt der Endozytose eine Momentaufnahme der Nachbarschaft der inserierten Photosonden in den jeweiligen Membranen gezeigt wird.

## 4.1 Synthesen

### 4.1.1 *Synthese der NBD-Derivate*

Für die Synthese der NBD-Derivate standen aus vorhergehenden Arbeiten<sup>1</sup> bereits NBD-Sonden mit einer Acylkettenlänge von C-6 zur Verfügung. Die Umsetzung mit deacyliertem Lyso-GM1 gelang in quantitativem Maßstab. Auch die darauf folgende Acylierung der freien Aminogruppe des Neuraminylrestes des deacyliertem Lyso-GM1 lieferte auf Grund der Tatsache, dass im Überschuss von Acetanhydrid gearbeitet wurde, nahezu 100% Aubeute. Die Reaktionsprodukte konnten auf Grund der Fluoreszenz der NBD-Sonde auch auf Dünnschichtplatten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 366 nm detektiert werden.

Somit stand für erste Insertionsstudien ein NBD-GM1-Derivat zur Verfügung, welches in seiner Fettsäuren Kettenlänge im Ceramidanker einer nicht-funktionellen C-10 Kette entspricht.

### 4.1.2 *Synthese der Biotin-Derivate*

Die Synthese der biotinylierten GM1-Derivate wurde auf Ergebnissen aus der Diplomarbeit aufgebaut. Wichtige Punkte dabei waren, dass bei der Aufreinigung der Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-Säure durch eine Entsalzung über einen SP-Sephadex C-25 Kationenaustauscher in seiner Pyridiniumform eine Ausbeutesteigerung erreicht werden konnte. Diese ersetzt in diesem Fall eine für Lipide üblicherweise verwendete Entsalzung über RP18 und liefert weitaus bessere Ausbeuten bei höherer Reinheit des Produkts. Die Aktivierung des Biotinlabels wurde über einen N-Succinimidylester durchgeführt. So konnte durch Verwendung des Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-Säure-N-succinimidylester ein GM1-Derivat mit einem kurz-kettigen Fettsäurerest (Octansäure) synthetisiert werden. Die entsprechende langkettige Verbindung wurde ebenfalls über Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-Säure-succinimidylester hergestellt. Der Biotinester lag aus den früheren Arbeiten vor, so dass auch hier lediglich die Kupplung des Labels mit dem Gangliosid erfolgen brauchte.

In einem ersten Schritt erfolgte die Kupplung eines deacetyliertem Lyso-GM1 („Total-deac“) mit dem Succinimidylester der Fettsäure an der freien Aminogruppe im

---

<sup>1</sup> Albrecht, B. (1991), Diplomarbeit

Sphingoidteil des Gangliosids. Diese kann auf Grund der höheren Reaktivität dieser Aminogruppe gegenüber derjenigen im Neuraminyrest mit leichtem Überschuss des Fettsäureesters durchgeführt werden. Dadurch erlangt man hierbei nahezu quantitative Ausbeuten.

Im Anschluss daran wurde die Biotinsonde an die freie Aminogruppe des Neuraminyrestes gekoppelt. Dieses gelang sowohl mit einem kurzkettigem GM1-Derivat (Oktansäure im Ceramidteil), als auch mit einem langkettigem Analogon (Octadekansäure i.e. Stearoyl- im Ceramidteil) und führte zu Ausbeuten der jeweiligen Biotin-GM1-Derivate von 8-26 %.

#### ***4.1.3 Synthese der TPD-Derivate***

Für die Untersuchungen der Lipidumgebung in Membranen standen bereits drei photoaktivierbare Fettsäuren mit C3-, C5- und C7-Acyllketten zur Verfügung. Diese entsprechen inklusive ihrer Trifluormethyldiazirinyphenyl-Gruppe in etwa einer Fettsäurenkette mit 9, 11 bzw. 13 C-Atomen. Um hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften den endogenen Membranlipiden möglichst ähnlich zu sein, bedurfte es einer weiteren Photosonde mit einer C10-Kette, die inklusive der TPD-Gruppe der Kettenlänge einer Palmitinsäure (C-16) entsprechen sollte. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit neben einer Photosonde mit C5-Kette eine längere photoaktivierbare Fettsäure mit einer Dekanoylkette analog synthetisiert.

Die Synthese des photolabilen TPD-Fettsäure-Succinimidylesters gelang dabei im Falle der kurzkettigen Verbindung mit einer Gesamtausbeute von 22% nach 10 Stufen. Die Synthese der längeren Photosonde gestaltete sich schwieriger, da die längere Kette zu einer merklichen Erhöhung von Siede- und Flüchtigkeitpunkt führte. Die bisher angewandten Aufreinigungsmethoden der Destillation waren daher nicht mehr möglich. Deswegen wurden zur Reinigung hauptsächlich säulenchromatographische Trennungen verwendet. Außerdem zeigte sich, dass bedingt durch die Länge der Acylylkette die Reaktivität der Säurefunktion bei der Veresterung mit tert. Butylester stark herabgesetzt war. Damit wurde diese Reaktion zum Flaschenhals der Gesamtsynthese. Konnten bei den restlichen Reaktionsschritten Ausbeuten zwischen 75-98% erzielt werden, lag diese bei dieser Veresterung bestenfalls bei 52%. Für die Totalsynthese des 10-(p-(3-

(Trifluormethyl)diazirinyphenyl)dekansäure-*N*-succinimidylester konnte ausgehend von 10-Phenyldekansäure, abhängig von erwähnter Veresterung, insgesamt eine Ausbeute von 5-10% erzielt werden.

## 4.2 Zellinsertionsexperimente mit derivatisierten Gangliosiden

Mit Hilfe der neusynthetisierten kurzkettigen NBD-GM1-Derivate konnte die Aufnahme und postendozytische Verteilung von derivatisierten Gangliosiden überprüft und bestätigt werden. NBD-C<sub>6</sub>-GM1 konnte unter Endozytoseblock bei 4°C in die Plasmamembran inseriert und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass ein kurzkettiges NBD-markiertes Glucosylceramid keine transversale Diffusion vollführen kann<sup>i</sup>, darf man davon ausgehen, dass auf Grund des noch größeren hydrophilen Oligosaccharidteils GM1 ebenfalls nicht dazu in der Lage ist. Somit kann angenommen werden, dass NBD-GM1 und alle weiteren Derivate nur in der äußeren Hälfte der Plasmamembran inseriert wurden. Nach Inkubation bei 37°C konnte eine Verteilung der markierten Ganglioside in intrazellulären punktuieren Strukturen festgestellt werden. Somit wurde das Gangliosid auch in die Zelle aufgenommen und nimmt am Endozytoseweg teil.

An Hand des biotinylierten GM1-Derivats konnte sowohl eine Plasmamembraninsertion, als auch eine Verteilung auf multivesikulären Körperchen im Inneren der Zelle nachgewiesen werden. Hier wurde eine Insertion in Domänen der Plasmamembran festgestellt. Dies bestätigt auch den Befund, wonach ein Biotin-markiertes GM1 in „rafts/patches“ und in *Caveolae* lokalisiert wurde.<sup>ii</sup> Untermauert wird diese These auch von den Ergebnissen mit photoaktiven GM1-Derivaten, die im folgenden besprochen werden sollen. Die hier gefunden Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Glykosphingolipide überwiegend als Bestandteile intralysosomaler Membranen abgebaut werden.<sup>iii</sup> Dafür spricht auch das häufige Auftreten von multivesikulären Lipid-Speicherorganellen bei Gangliosidosen und anderen Sphingolipid-Speicherkrankheiten. Die Verteilung von Biotin-markiertem GM1 auf

---

<sup>i</sup> Rosenwald, A.G. und Pagano. R.E. (1993), Adv. Lipid Res.

<sup>ii</sup> Möbius, W. et al. (1999), J. Histochem. Cytochem.

<sup>iii</sup> Sandhoff, K. und Kolter, T. (2003), Phil. Trans. Soc. R. Lond.

Membranen intraendosomaler bzw. -lysosomaler Vesikel entspricht wohl der Verteilung von endogenem GM1.

### 4.3 Lipidumgebung der TPD-Photosonden in Modellmembranen

In den Experimenten mit GM1-Photosonden in Modellmembranen (Liposomen) konnte gezeigt werden, dass man nach Belichtung der Photosonden und anschließender dünnschichtchromatographischen Trennung ein spezifisches Kopplungsmuster von DC-Banden erhält. Die Analyse dieses Bandenmusters erfolgte durch den dünnschichtchromatographischen  $R_f$ -Wert der Kopplungsprodukte wie auch durch ihre massenspektrometrische Charakterisierung. Durch diese Charakterisierung war es möglich, die den Sondenmolekülen direkt benachbarten Lipide zu identifizieren und die Häufigkeit als Nachbarn zu bestimmen.

Durch die Belichtungsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass das Bandenmuster der Kopplungsprodukte von der jeweiligen Lipidzusammensetzung der Liposomen abhängt. So konnte in den Liposomenexperimenten eine starke Affinität der Sonde zu DOPE festgestellt werden. Da DOPE im Gegensatz zu Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin eine sterisch wenig abgeschirmte positive Teilladung besitzt, kann vermutet werden, dass die TPD-GM1-Sonde mit ihrer negativen Ladung eine Affinität zu diesem Lipid besitzt. Vorstellbar wäre, dass der Zuckerbaum der Sonde sich in der Membran auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Lipid assoziiert. Dieses mag u.U. zu einer Phasensegregation führen. Dahingegen sind Kopplungen mit Sphingomyelin, sowie DOPA bzw. DOPS eher weniger präferiert. Bei DOPS oder DOPA mag die negative Nettoladung dieser Lipide dafür verantwortlich sein, welche zu Abstoßung mit der ebenfalls negativen Photosonde führen könnten. Trotz dieser Befunde erscheint die Kopplung mit BMP bevorzugt zu sein. Dies weist auf eine deutliche Präferenz der TPD-Sonde zu diesem Lipid hin.

In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass Cholesterol in biologischen Membranen offenbar Wechselwirkungen mit den (Glyko-)Sphingolipiden zeigt und in Mikrodomänen eng mit diesen vergesellschaftet ist bzw. durch Ausbildung einer

„liquid-ordered-phase“ von den anderen Lipiden abgesondert wird.<sup>i</sup> Es ist bekannt, dass ca. 90 % des freien zellulären Cholesterols von Fibroblasten in der Plasmamembran lokalisiert sind.<sup>ii</sup> Wählt man nun eine Lipidzusammensetzung der Liposomen, die in etwa der Zusammensetzung der Lipide in der extrazellulären Seite der PM entspricht, so wird nach Belichtung eine Gleichverteilung der Insertionsprodukte gefunden. Auf Grund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass nicht nur bimolekulare Wechselwirkungen an der Ausbildung der „rafts“ beteiligt sind, sondern noch weitere Komponenten der Plasmamembran eine Rolle spielen, die nicht in den Modellmembranen enthalten waren bzw. nicht durch diese simuliert werden konnten.

Was auch gerade im Falle der Cholesterolkopplungen auffällt, sind die verschiedenen Isomere der Kopplungsprodukte, welche nach Photolyse der Sonden entstehen können. Ob diese Positionsisomere eher durch eine Bewegung der Sonden senkrecht zur Ebene der Lipidschicht entstehen oder ob es sich um Diastereomerenpaare, welche durch die unterschiedliche Angriffsrichtung des Carbens im Moment der Photokopplung entstehen, handelt, ist nicht zu unterscheiden. Neben Cholesterol findet man diese Aufspaltung der Banden auch bei der Wasserinsertion, wo gerade bei dem kurzkettigen Derivat häufig eine Doppelbande auftritt

Die Wasserinsertion war ein signifikantes Kopplungsprodukt in Modellmembranen. Hier fiel auf, dass zum einen der Anteil dieser Insertion von der Länge der Acylkette der Photosonde abhängt und zum anderen von der Zusammensetzung der Liposomen. So sinkt die Insertionsrate vom kurz- zum langkettigen Derivat um mehr als 40%. Bei gleichbleibender Kettenlänge sinkt die Insertionsrate um ca. 30%, wenn neben DOPC weitere Lipide wie Cholesterol beigemischt sind. Dies bestätigt vorhergehende Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass nach Belichtung einer C<sub>3</sub>-TPD-GM1-Photosonde in Cholesterol-haltigen Liposomen der Anteil der Wasserinsertion gegenüber Belichtung in reinen Phospholipid-Liposomen (PC, PE bzw. PS) deutlich sinkt.<sup>iii</sup> Vermutlich wird die Membran durch das Cholesterol verdichtet, wodurch sich weitaus weniger Wasser in der Membran befinden würde. Auch sind die längerkettigen Photosonden stärker in der Membran verankert, als die kurzkettigen Derivate, was ebenfalls eine geringere Insertion in Wasser erklärt. Die

---

<sup>i</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

<sup>ii</sup> Lange, Y. (1991), J. Lipid Res.

<sup>iii</sup> Meier, E.M. et al. (1990), Chem. Phys. Lipids

Versuche mit unterschiedlich langen Acylketten legen nahe, dass ein mehr oder weniger großer Teil der Wasserinsertionsprodukte überwiegend durch die „off-rate“ der Sonden erfolgt. Ein weiterer Teil kommt durch das in der Membran enthaltene Wasser zustande, welches vermutlich in tieferen Membranbereichen weniger häufig vorkommt als nahe der Grenzfläche zur wässrigen Phase.

#### 4.4 Lipidumgebung der TPD-Photosonden in kultivierten Zellen

Beim Einbau der verschiedenen Sonden in Zellmembranen machte sich die unterschiedliche Kettenlänge deutlich bemerkbar. Konnte das C<sub>5</sub>-Derivat über einen Lipid:BSA-Komplex gefüttert werden, musste das C<sub>10</sub>-TPD-GM1 über Mizellen den Zellen angeboten werden. So erniedrigte sich die prozentuale Einbaurrate pro Milligramm Protein von ca. 75% der angebotenen Menge (ca. 15 nmol von 20 nmol C<sub>5</sub>-TPD-GM1; Kapitel 3.5.1 – Tabelle 3-8) auf lediglich 7-9% (bei C<sub>10</sub>-TPD-GM1 ca. 1,56-1,81 nmol) je nach Zelltyp (siehe Kapitel 3.5.2 – Tabelle 3-10).

Die Einbaurrate von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 liegt dabei in Größenordnungen, die auch für C<sub>5</sub>-TPD-Glc-S-Cer-Sonden<sup>i</sup> gefunden wurden. Im Vergleich zu entsprechenden Thioglykosphingolipiden<sup>ii</sup> (C<sub>8</sub>-Gal-S-GlcCer; ca. 21 nmol/mg Protein) und kurzkettigen GM1-Gangliosiden ohne Label zeigte die C<sub>5</sub>-TPD-Photosonde jedoch schwächeren Einbau. Gegenüber NBD-markierten Derivaten (~7 nmol/mg Protein bei NBD-C<sub>8</sub>-Gal-S-GlcCer<sup>i</sup> und ~12 nmol/mg Protein bei NBD-C<sub>8</sub>-Lac-S-Cer<sup>iii</sup>) zeigte sich jedoch ein deutlich stärkerer Einbau der TPD-Derivaten. Die geringere Einbaurrate der fluoreszierenden Derivate ist wohl auf die höhere Polarität der NBD-Gruppe zurückzuführen.

Weiterhin konnten Befunde aus Versuchen mit kurzkettigen TPD-Glc-S-Cer-Sonden bestätigt werden. In diesen zeigte sich, dass das C<sub>7</sub>-Derivat innerhalb einer sechsständigen Inkubationsdauer nur zu 1,3 % verstoffwechselt wurde, während C<sub>3</sub>- und C<sub>5</sub>-Glc-S-Cer-Sonden zu 4,3 bzw. 3,6 % glykosyliert wurden. Im Falle der in dieser Arbeit genutzten C<sub>5</sub>- bzw. C<sub>10</sub>-Photosonde konnten selbst bei längerer Inkubation keine Glykosylierungsprodukte erkannt werden. Dies kann bei den

---

<sup>i</sup> Hörschemeyer, J. (2001), Dissertation

<sup>ii</sup> Pütz, U. (1996), Dissertation

<sup>iii</sup> Albrecht, B. (1996), Dissertation



längerkettigen Verbindungen durch deren niedrigere „off-rate“ von den intraendosomal/-lysosomal Membranen und damit durch ein längeres Verbleiben in den endozytotischen Kompartimenten erklärt werden.

#### **4.4.1 Insertion von C<sub>5</sub>-TPD-GM1 in die Plasmamembran**

Durch Untersuchungen in den letzten Jahre konnte belegt werden, dass Sphingolipide in bestimmten Membranbereichen angereichert vorkommen, die man auch als Mikrodomänen oder „rafts“ bezeichnet.<sup>i</sup> Wobei beachtet werden sollte, dass (wie in der Einleitung erläutert – siehe Kapitel 2.3) die Existenz von Mikrodomänen bislang nicht bewiesen ist, sondern lediglich postuliert wird. Das bedeutet nicht, dass der Begriff der „lipid rafts“ in der Plasmamembran vollständig falsch ist, jedoch sollte man die Mikrodomänen nicht als anerkannte Tatsache ansehen, sondern eher als ein unbewiesenes Modell.<sup>ii</sup>

Offenbar besitzen diese Membrandomänen eine andere Lipid- und Proteinzusammensetzung als die sie umgebenden Membranareale und haben Anteil an bestimmten zellulären Prozessen. So zeigte sich, dass Sterole einen deutlichen Effekt auf Membranformation und Domänenbildung besitzen, wobei Ceramid (in gewissen Grenzen) an Cholesterol-reichen Stellen, vermutlich im Austausch gegen Cholesterol, inseriert.<sup>iii</sup> Durch Versuche mit photoaktiven Gangliosid-Sonden sollten die in zellulären Membranen direkt benachbarten Lipide untersucht und charakterisiert werden, sowie eine Lokalisation des am Abbau von vielen Lipiden beteiligten Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) auf inneren Membranen von multivesikulären Körperchen und Lysosomen bestätigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass C<sub>5</sub>-TPD-GM1 unter Endozytoseblock bei 4°C in die exoplasmatische Seite der Plasmamembran von humanen Fibroblasten inseriert werden kann. Dem zu Folge war es möglich, in dieser Membran die direkte Lipidnachbarschaft der Sonden zu bestimmen. In der Literatur findet man für die Zusammensetzung dieser Membran Anteile von PC und SM, die zusammen ca. 50-60 % ausmachen und einen Cholesterolgehalt von ca. 30-40 %.<sup>iv</sup> Für die Umgebung der C<sub>5</sub>-Photosonden zeigten sich in kultivierten Zellen ganz andere Verhältnisse. Im

---

<sup>i</sup> Simons, K. und Ikonen, E. (1997), Nature

<sup>ii</sup> Munro, S. (2003), Cell

<sup>iii</sup> London, E. (2002), Curr Opin Struct Biol.

<sup>iv</sup> van Meer, G. und van Genderen, I.L. (1994) Subcellular Biochemistry

Gegensatz zu den Versuchen mit Modellmembranen, in denen man eine Gleichverteilung der Insertionsprodukte vorfand, konnte dies bei Belichtung der Sonden in der Plasmamembran von Fibroblasten nicht bestätigt werden. Als Hauptkomponente wurde vor allem die Insertion in Cholesterol erhalten. Mit ca. 75% vom Anteil der Lipidkopplungsprodukte (i.e. Anteil Insertionsprodukt nach Normierung abzgl. Umlagerungsprodukt, Wasserinsertion und Multimeren) liegt dieses Insertionsprodukt doch deutlich oberhalb der Werte einer Gleichverteilung. Im Verhältnis zu PC und SM findet man eine Verteilung von ungefähr 9,5 : 2 : 1 (Cholesterol : PC : SM). Da bisher in Modellmembranen keine besonderen Präferenzen oder Affinitäten von Gangliosidmolekülen zu Cholesterol aufgezeigt werden konnten, lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass sich die Photosonde während der Kopplung in Cholesterol-reichen Domänen befunden haben muss. Dies bestätigt den Befund aus den Versuchen mit Biotin-markiertem GM1. Wie erwähnt, konnte dieses ebenfalls in „rafts“ und auch in *Caveolae*, welche ebenfalls einen hohen Gehalt dieses Sterols, aufweisen lokalisiert werden.

Außer mit den genannten Lipiden konnten keine weiteren Kopplungsprodukte wie Glykolipide identifiziert werden.

#### **4.4.2 Kopplungsprodukte von C5-TPD-GM1 in inneren Membranen**

Nach Insertion der Sonden in die Plasmamembran und Inkubation bei 37°C werden die TPD-GM1-Sonden in den Endozytoseweg aufgenommen, und es zeigte sich bereits nach kurzer Zeit ein ganz anderes Lipidkopplungsmuster, als unmittelbar nach der Insertion in die Plasmamembran. Man erkennt, dass die Sonden die Cholesterol-reichen Domänen verlassen. So nimmt die Insertionsrate in Cholesterol schon während der ersten 15 Minuten um 20 % ab und ist nach 2 Stunden fast auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes gesunken. Dagegen findet man einen deutlichen Anstieg der Insertionsrate für das Kopplungsprodukt mit PC. Obwohl dieses eines der Hauptbestandteile der Plasmamembran ist, war es dort nur im untergeordnetem Maße markiert worden. Hier konnte bereits nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C eine Verdopplung des Anteils des Insertionsprodukts von 13 auf 28 % nachgewiesen werden. Bei Sphingomyelin war der Anstieg noch drastischer. Er verdreifachte sich innerhalb dieser Zeit von 7 auf 22 %.

Diese Befunde legen nahe, dass die Gangliosid-Derivate die Cholesterol-reichen Domänen verlassen, und nach erfolgter Endozytose auf inneren Membranen keine spezifische Assoziation mit Cholesterol mehr erfolgt. Dies bestätigt Ergebnisse, in denen gezeigt wurde, dass der Cholesterolgehalt limitierender Membranen auf dem Endozytoseweg stark abnimmt und der Gehalt in späten endozytotischen Organellen ebenfalls stark sinkt.<sup>i</sup>

#### ***4.4.3 Kopplungsprodukte von C<sub>10</sub>-TPD-GM1 in späten abbauenden Organellen***

Im Gegensatz zu den Experimenten in Modellmembranen, wo gut auswertbare Dünnschichtchromatogramme mit klar definierten Banden erhalten wurden, zeigten die Kopplungsmuster in den späten endozytotischen Kompartimenten kultivierter Zellen Strukturen, die eine exakte Analyse schwierig gestalteten. So zeigten die Banden teilweise diffuse Abgrenzungen, welche eventuell aus Überlagerung von verschiedenen Positionsisomeren entstanden waren. Durch die längere Acylkette der C<sub>10</sub>-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. Diese tiefere und festere Bindung in den Membranen zeigt zum einen die geringere „off-rate“ des Derivats und zum anderen eine geringere Wasserinsertion. Im Vergleich zur kurzkettigen C<sub>5</sub>-TPD-GM1-Sonde, bei der Wasserinsertionen von 30-38 % gemessen werden konnten, findet man hier in den Zellexperimenten nur zwischen 10 und 11 % Kopplungsprodukt mit Wasser (mit Ausnahme der CHO-Zellen). Da auch ein Großteil dieses Anteils auf unvollständige Trypsinierung zurückzuführen ist, kann man sogar noch von geringeren Anteilen an Wasserinsertionsprodukt in den Zellmembranen ausgehen.

Die Bindung in flexiblere Abschnitte von Lipiden zeigt sich vor allem am Cholesterol, wo auf den Dünnschichtplatten jeweils nicht nur diffuse Banden auftreten, sondern sogar scharfe Banden mit unterschiedlichem R<sub>f</sub>-Wert. Dies kann durch die Insertion in dessen Kern wie auch in die Seitenkette am C-17 des Sterols herrühren.

Betrachtet man die unterschiedlichen Zelltypen, so kann hier keine Differenzierung bzgl. des Kopplungsmusters getroffen werden. Deutlich zu erkennen ist der im

---

<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (2003), Traffic

Vergleich zu den Ergebnissen mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1 gesunkene Anteil an Cholesterolinserktion. Lediglich in Zellen von Patienten mit der Erkrankung Niemann-Pick-TypC findet sich ein Anteil an Cholesterolinserktion, der über denen von PC und SM liegt. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da in diesem Zelltyp eine Speicherung großer Mengen an Cholesterol in den späten Endosomen erfolgt.<sup>i</sup>

Das Verhältnis der Kopplungsprodukte mit Phosphatidylcholin und mit Sphingomyelin betrug meist 3 : 1. Lediglich in NPC-Zellen, wo das Kopplungsprodukt mit Cholesterol als „Konkurrenzprodukt“ anfällt, findet sich ein 2 : 1 Verhältnis der Kopplungsprodukte mit PC und SM. Dies bestätigt die Tendenz aus den Versuchen mit C<sub>5</sub>-TPD-GM1, wo auch eine Verhältnis von 3 : 2 zu vermerken war. Auch der Befund, dass der Anteil an PC-Insertionsprodukt zunimmt, kann bestätigt werden. So ist dieser nach 36 Stunden Inkubation mit Werten um die 30 % nach der Photokopplung mit BMP das zweithäufigstes Kopplungsprodukt.

Nach mehrstündiger Inkubation der Zellen mit den Sonden bei 37°C können die Moleküle auch in innere, abbauende Kompartimente transportiert werden. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Lysosomen im Vergleich zu den übrigen Organellen der Zelle einen höheren Anteil an Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) aufweisen.<sup>ii</sup> Nach dem Modell des lysosomalen Abbaus<sup>iii</sup> ist zu erwarten, dass die Photosonden wie andere Sphingolipide im Verlauf der Endozytose zu den intraendosomalen und -lysosomalen Membranen transportiert werden. Eine Photoinsertion in BMP kann erwartet werden, wenn BMP, wie postuliert auf Membranen intralysosomaler Vesikel am Abbau beteiligt ist. Dazu ist natürlich Voraussetzung, dass sich die TPD-Sonden entsprechend NBD-markiertem Glucosyl-thio-ceramid verhalten würden, welches nach längerer Zeitdauer in Lysosomen akkumuliert.<sup>iv</sup>

In den Versuchen mit verschiedenen Zelltypen konnten auch in jedem Fall Kopplungsprodukte mit BMP nachgewiesen werden. Die Analyse der Kopplungsprodukte erfolgte, neben der Zuordnung der Banden durch ihre R<sub>f</sub>-Werte, durch massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS. Da jedoch kein natürliches BMP zur Verfügung stand, musste auf synthetisches zurück gegriffen werden (*Avanti Polar Lipids*). Dieses entspricht in seiner Konfiguration nicht dem natürlichen (sn1:sn1'-BMP), ist jedoch konfigurationsisomer (sn3:sn3'-

---

<sup>i</sup> Lange, Y. et al. (2000), J. Biol. Chem.

<sup>ii</sup> Wherrett, J.R. und Huterer, S. (1972), J. Biol. Chem.

<sup>iii</sup> Fürst, W. und Sandhoff, K. (1992), Biochim. Biophys. Acta

<sup>iv</sup> Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1990), Biochemistry

BMP). In Modellmembranen konnte die Bande des BMP-Kopplungsproduktes mit einer Masse von 2387,55 amu detektiert werden. Dies entspricht dem Natriumaddukt des TPD-GM1-Derivats mit einer Alkylkettenlänge von C-20 im Sphingoidteil und einem Dioleyl-BMP. In den Zellversuchen mit verschiedenen Zelltypen konnte dieser Wert auch massenspektrometrisch gefunden werden. Daneben fanden sich auch Peaks, die anderen Fettsäurekettenlängen und Sättigungsgraden des BMP entsprechen, aber auf Grund mangelnder Vergleichsmöglichkeiten nicht zweifelsfrei zugeordnet werden konnten.

Dabei stellen diese Insertionsprodukte jeweils den Hauptanteil dar und schwanken je nach Zelltyp zwischen ~44-48 %. Dies bestätigt neuere Befunde, die eine Erhöhung der Konzentration von BMP in späten endozytotischen Vesikeln hauptsächlich in inneren Vesikeln und Membranen gezeigt haben.<sup>i</sup> Damit erscheint es naheliegend, dass BMP den Abbau von Lipiden und Glykolipiden in intralysosomalen Vesikeln stimuliert. Ob dies durch eine „Anhebung“ des Moleküls geschieht, so dass der Angriff durch SAP erleichtert wird oder einfach nur durch „Auflockerung“ der Membran, bleibt noch zu klären.

---

<sup>i</sup> Möbius, W. et al. (2003), Traffic

## 5 *Material und Methoden*

### 5.1 **Material**

#### 5.1.1 *Geräte*

- *LiposoFast low pressure homogenizer*, Avestin (Ottawa, CAN)
- *Horizontal-Entwicklungskammer für DC's 10x10 cm und 10x20 cm*, Camag (Mutenz, CH)
- *Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-Carb 1900*, Canberra Packard (Frankfurt)
- *Gefriertrocknungsanlage Typ Lyovac GT3*, Leybold-Heraeus (Hanau)
- *HPLC-Anlage: HPLC Pump 515 & Fraction Collector II*, Waters (Milford, MA, USA)
- *Kernresonanzspektrometer AMX 400*, Bruker (Karlsruhe)
- *Massenspektrometer für Fast-Atom-Bombardment ZAB HZ*, VG Analytical (Manchester, GB)
- *Massenspektrometer für Fast-Atom-Bombardment ZAB-T Tandem*, Fisons Instruments (Manchester, GB)
- *Massenspektrometer Q-TOF2 (ESI-TOF)*, Micromass (Manchester, GB)
- *Massenspektrometer TOFSpec E (MALDI-TOF)*, Micromass (Manchester, GB)
- *Photoimager Fuji BAS 1000 Imaging Analyzer*, Fuji Photo Film Co. (Tokyo, J)
- *Reactitherm Heating/Stirring Module*, Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)
- *Ultraschallbad Sonorex RK 100*, Bandelin (Berlin)
- *Ultrazentrifuge L8-80M mit Rotor SW41Ti*, Beckman Instruments (München)
- *UV-Lampe Ultramed 2000W*, Osram (München)
- *UV-Lampe für zwei Wellenlängen, 254/366 nm, 8 W*, Camag (Mutenz, CH)
- *Zentrifuge Megafuge 1.0R*, Heraeus (Osterode)

Alle weiteren benutzten Geräte werden bei den entsprechenden Arbeitstechniken beschrieben.

### 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

- [1-<sup>14</sup>C]-Acetanhydrid (114 mCi/mmol), Amersham (Freiburg)
- [4-<sup>14</sup>C]-Cholesterol, Amersham (Freiburg)
- 5-Phenylpentansäure, Lancaster (Mühlheim/Main)
- 10-Phenyldekansäure, Lancaster (Mühlheim/Main)
- $\gamma$ -Aminobuttersäure (sowohl radiokohlenstoffmarkiert am C-1, als auch unmarkiert), Sigma (Deisenhofen)
- Bis(monoacylglycero)phosphat, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
- Cardiolipin (aus Rinderherz), Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
- Cholesterol, Sigma (Taufkirchen)
- D-Biotin-N-succinimidylester, Fluka (Buchs, CH)
- DC-Platten (Kieselgel Si60) mit und ohne Fluoreszenzindikator  $F_{254}$ , Merck (Darmstadt)
- DEAE-Sephadex A25, Pharmacia (Uppsala, S)
- Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidsäure, Sigma (Taufkirchen)
- Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, Sigma (Taufkirchen)
- Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin, Sigma (Taufkirchen)
- Dipalmitoyl-L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serin, Sigma (Taufkirchen)
- GM1 (mit Sphingoidbasen der Kettenlänge  $C_{18}$  und  $C_{20}$ ) Fidea S.p.A. (Abano Terme, I)
- HPTLC-Platten 10x10 cm (Kieselgel Si60), Merck (Darmstadt)
- Kieselgel Si60 (15-40  $\mu$ m, 40-63  $\mu$ m, (63-200  $\mu$ m), Merck (Darmstadt)
- LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu$ m), Merck (Darmstadt)
- L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-serin (aus Rinderhirn), Sigma (Taufkirchen)
- N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, Janssen Chimica (Geel, B)
- N-Oleoyl-sphingomyelin, Sigma (Taufkirchen)
- Phosphatidylcholin (aus Ei-Lecithin), Lipoids (Ludwigshafen)
- Rinderserumalbumin (BSA), Sigma (Deisenhofen)
- RP-HPLC-Säule ProSep C-18 5  $\mu$ , 250x20 mm, Latek (Eppelheim)
- SP-Sephadex C-25, Pharmacia Biotech (Uppsala, S)

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

### 5.1.3 Biologische Materialien

#### 5.1.3.1 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) und Fibroblasten mit Morbus Landing (Sz1 oder Sz4 (Nomenklatur in unseren Zellkultur-Unterlagen)) wurden in DMEM mit 10 % (v/v) hitzebehandeltem (30 min bei 56°C) FKS in einer 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre bei 37°C bis zur Konfluenz angezogen.<sup>i</sup> Für Metabolismusstudien wurden 2,2 x 10<sup>5</sup> Fibroblasten in 8 cm<sup>2</sup> Kulturschalen bzw. für Insertionsstudien 6 x 10<sup>5</sup> Fibroblasten in 21 cm<sup>2</sup> Schalen ausgesät und 1-2 Tage bei Typ Morbus Landing 2 Wochen bis zur Konfluenz herangezüchtet.

#### 5.1.3.2 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-LifeTechnologies* (Paisley, Großbritannien) und 3,6 g NaHCO<sub>3</sub>. Zusätzlich wurden dem Medium 2 ml wässrige Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 0,1 mg/ml) von *Biochrom KG* (Berlin, Deutschland) zum Schutz gegen Keimwachstum 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*, Taufkirchen, 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,26 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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

---

<sup>i</sup> Weitz, G. et al. (1983), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem



MgSO<sub>4</sub>-Lösung (20 g/l) sowie 5 ml einer CaCl<sub>2</sub>-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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4. Für 1 l der 10-fach konzentrierten Stammlösung wurden 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 1,145 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 μM 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 Ganglioside wurden von 20 cm-hohen Glas-DC-Platten ermittelt; die Laufstrecke betrug hierbei 16 cm. Die photoaktivierbaren Fettsäuren wurden auf 10 cm-hohen Glas-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 65:40:8 (v/v/v) als mobile Phase (bzw. Chloroform/Methanol/30 mM  $\text{CaCl}_2$ /8 mM KCl 50:50:4:8 (v/v/v/v) bei Stoffwechseluntersuchungen).

#### 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 :

*Molybdatophosphorsäure-Tauchbad* (*Brenner-Weiß et al. 1992*): Zusammensetzung: 25 g Molybdatophosphorsäure, 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-vermittelte-Verkohlung*: 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.

3. Radioaktive Produkte wurden durch Photoimaging 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  $^1\text{H}$ -NMR- sowie 100 bzw. 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -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  $\delta$  (angegeben in ppm), der im jeweils angegebenen Lösungsmittel (Chloroform- $\text{d}_1$  bzw. Methanol- $\text{d}_6$ ) 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- $\text{d}_1$  7.24 ppm, sowie bei Methanol- $\text{d}_6$  oder Mischungen 3.35 ppm) eingestellt. Mehrfachaufspaltungen werden in der Reihenfolge zunehmender Kopplungskonstanten angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s - Singulett, d - Duplett, t - Triplett und m - Multipllett, b - breit. Die Verschiebungen und Kopplungskonstanten wurden auf Grund 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 (Kap. 5.3) wurde jeweils die Peakintensität relativ zum Basispeak in Prozent angegeben (Basispeak = 100 %).

*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" ausgestattet.<sup>1</sup> Hierfür wurden die Substanzen vorher in eine Matrix (m-Nitrobenzalkohol) 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/ $\mu$ l in Methanol oder Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) gelöst. 1  $\mu$ l der Probe wurde mit 1  $\mu$ l Matrixlösung gemischt und 1  $\mu$ 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 sowohl im positiven, als auch negativen Modus an einem Q-TOF2-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, Großbritannien) mit Nanospray-Quelle aufgenommen. Die Proben wurden in einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l in Acetonitril/0,1 % Ameisensäure 1:1 (v/v) gelöst. Ca. 5  $\mu$ l der Lösung wurden in eine

---

<sup>1</sup> Egge, H. und Peter-Katalinic, J. (1987), Mass Spectrom. Rev.

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. Nach Bindung an Proteine, verschiebt sich das Extinktionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Es wurden Aliquote der homogenisierten Zellen auf deren Proteingehalt untersucht. Dabei dienten ansteigende Mengen (0,25-5  $\mu\text{g}$ ) Rinderserumalbumin (BSA) (*Sigma*) als Standard. Die Messungen erfolgten an den computergesteuerten 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<sup>i</sup> 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.

---

<sup>i</sup> MacDonald, R.C. et al. (1991), *Biochim. Biophys. Acta*

### 5.2.2.2 Belichtung der Liposomen

Die Liposomen wurden in 21 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen oder in „6-well“-Platten mit 8 cm<sup>2</sup> 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 gefriergetrocknet. 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. Um Binder und andere wasserlösliche Verunreinigungen aus den DC-Platten abzutrennen wurde das extrahierte Material vorbehandelt.<sup>i</sup> 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.

### 5.2.2.4 Gelfrierschnitt-Technik und Immunmarkierung

Zur Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder mussten die Zellen vorher fixiert werden. Neben der erwähnten Fixierung mit Osmiumtetroxid kann hier die

---

<sup>i</sup> modifiziert nach: Folch, J. et al. (1957), J. Biol. Chem

Gefrierschnitt-Technik angewendet werden. Dazu wurden die Fibroblasten nach erfolgter Inkubation mit Proteinase K geerntet, zentrifugiert und mit 4 % Formaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd in 0,2 M HEPES pH 7,2 fixiert. Die Zellpellets ließ man über Nacht bei 4 °C durch 50 % Polyvinylpyrrolidon (PVP-10000) und 1,15 M Saccharose in 0,1 M HEPES infiltrieren und anschließend in flüssigem Stickstoff gefrieren. Die Gefrierschnitte wurden in einem Gemisch aus 2 % Methylcellulose und 2,3 M Saccharose (1:1, v/v) aufgenommen.<sup>i</sup> Vor der Immunmarkierung mussten die getauten Gefrierschnitte mit Wasser gespült werden. Die Markierung erfolgte dann mit Anti-Biotin-Antikörpern der Ziege, die mit 10 nm großen Goldkörnchen konjugiert waren. Nach Fixierung mit 2 % Glutaraldehyd in 0,2 M HEPES pH 7,2 wurden die Schnitte in 1,8 % Methylcellulose und 0,4 % Uranylacetat eingebettet.<sup>ii</sup> Die Aufnahme der Bilder erfolgte dann bei 80 kV mit einem Elektronenmikroskop CM 120 der Firma Philips.

### **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<sup>-4</sup>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 4°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.

---

<sup>i</sup> Liou W. et al. (1996), Histochem. Cell Biol.

<sup>ii</sup> Griffiths G. et al. (1984), J. Ultrastruct. Res.

### 5.2.3.3 Inkubation langkettiger Ganglioside aus Mizellen

Aus der Stocklösung des gewünschten Gangliosidderivats wurde die entsprechende Menge (je nach Versuch 20-50 nmol) in ein Schraubkappenglas pipettiert und das organische Lösungsmittel im Argonstrom entfernt. Der Rückstand wurde in 20  $\mu$ l Ethanol angelöst und mit einer wässrigen HMEM-Lösung zu einer 10  $\mu$ M Lösung des Gangliosids aufgefüllt. Danach wurde die Lösung mehrfach im Ultraschallbad sonifiziert. Die Zellen, die sich nach Aussaat in DMEM mit 10 % FKS befanden, wurden dreimal mit HMEM gewaschen und danach für 2 h mit der 10  $\mu$ M Lösung der Gangliosid-Lösung in HMEM bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde dieses Medium entfernt und die Zellen für 24-72h bei 37°C inkubiert.

### 5.2.3.4 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“).<sup>i</sup> Dazu wurden die Zellen auf 7°C gekühlt und dreimal 10 Minuten mit je 2 ml 10<sup>-4</sup> M BSA-Lösung in HMEM inkubiert und anschließend erneut mit kaltem HMEM gewaschen.

### 5.2.3.5 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.

### 5.2.3.6 Zellernte

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 vom Boden der Zellschale geschabt. Durch

---

<sup>i</sup> van Meer, G. et al. (1987), J.Cell Biol.



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* (5.2.1.5) wurde ein Aliquot entnommen.

#### **5.2.3.7 Trypsinierung von Zellen**

Nach der Inkubation und Belichtung wurde das Inkubationsmedium entfernt. Danach wurden die Zellen mit einer EDTA/Trypsin-Lösung behandelt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die Lösung entfernt und die Zellen, wie unter 5.2.3.6 erklärt, weiterbehandelt.

#### **5.2.3.8 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.

#### **5.2.3.9 Entsalzen von Reaktionsansätzen und Abtrennung von wasserlöslichen Komponenten**

Amphiphile Reaktionsprodukte wurden mittels Umkehrphasen-Chromatographie von wasserlöslichem Material gereinigt.<sup>i</sup> 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.

---

<sup>i</sup> Williams, M. und McCluer, R. (1980), J. Neurochem.

#### 5.2.3.10 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  $\mu$ l 4 M NaOH in Methanol (Endkonzentration 0,1 M) pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend zur Neutralisation mit 20  $\mu$ l Essigsäure (350  $\mu$ mol) 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.

## 5.3 Synthesen

### 5.3.1 Synthese der photoaktivierbaren $C_{5/10}$ -Fettsäure(n)

Entsprechende Synthesen von photoaktivierbaren Fettsäuren ( $C_3$ -,  $C_5$ - bzw.  $C_7$ -Acylkettenlänge) wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und beschrieben.<sup>1</sup> Während der Arbeiten mit den  $C_5$ -TPD-GM1 Photosonden hat sich die Bedeutung der Länge der Acylkette herausgestellt, weshalb eine weitere photoaktivierbare Fettsäure mit  $C_{10}$ -Acylkette in Homologie zu der bereits synthetisierten Fettsäuren hergestellt wurde.

(Arbeitsvorschrift für 5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentansäure-*N*-succinimidylester entsprechend)

#### 10- Phenyldekansäure-methylester (1)

21,75 g (87,5 mmol) 10-Phenyldekansäure wurden in 25 ml (617 mmol) Methanol suspendiert; dann wurde 0,75 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  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, zweimal mit 10 ml Wasser gewaschen und anschließend über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet. Der Ether wurde im schwachen Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl konnte über Kieselgel 63-200  $\mu\text{m}$  mit Petrolether/Essigsäure 9:1 (v/v) als mobile Phase gereinigt werden.

$R_f$  (Petrolether/Essigsäure 9:1 (v/v) Edukt 0,40; Produkt 0,52.

Ausbeute: 21,5 g (82 mmol) = 93 %.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.27-1.41 (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.55 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.22 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.5 Hz, H-2), 2.52 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 3.60 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.10 (m, 3 H, Bz), 7.19 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz, Bz)

<sup>1</sup> Hörschemeyer, J. (1997), Diplomarbeit

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.83$  (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-3), 28.85 (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-4), 28.95 (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-5), 31.23 (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-6), 34.03 (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-2), 35.83 (1 C,  $\text{CH}_2$ , C-7), 51.41 (1 C,  $\text{OCH}_3$ ), 125.58 (1 C,  $\text{CH-Bz}_4$ ), 128.20 (2 C,  $\text{CH-Bz}$ ), 128.35 (2 C,  $\text{CH-Bz}$ ), 142.65 (1 C,  $\text{C-Bz}_1$ ), 174.22 (1 C,  $\text{COOR}$ )

HRMS : Berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_2$  ( $[\text{M}]^+$ ): 262,1933 (ex.), 262,39 (av.)  
Gefunden 262,1537 (18 %)  
230 (32 %,  $[\text{M-CH}_3\text{OH}]^+$ ), 91 (100 %,  $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ ), 74 (26 %,  $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$ )

### 10-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)dekansäure-methylester (2)

26,5 g (0,4 mol)  $\text{AlCl}_3$  wurden in 50 ml Chloroform suspendiert. In der Kälte (0-5°C) wurden 15 g (10 ml, 0,075 mol) Trifluoressigsäureanhydrid unter Rühren langsam hinzugefügt und über einen Zeitraum von 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden bei der gleichen Temperatur 11 g (0,04 mol) des Esters (**1**) zugetropft. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung in einem Scheidetrichter auf 500 ml Eis gegeben. Mit 3 ml konz. Salzsäure wurde ausgefallenes Aluminiumhydroxid in Lösung gebracht. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 50 ml Wasser und gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgetrennt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Heptan/Essigsäureethylester 9:1 (v/v) aufgereinigt.

$R_f$  (Heptan/Essigsäureethylester 9:1, v/v) = 0,33.

Ausbeute: 10 g (28 mmol) = 70 % (gelbes Öl)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.28$ -1.44 (m, m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.56 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.22 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.5 Hz, H-2), 2.61 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 3.57 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.26 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz,  $\text{Bz}_{2,6}$ ), 7.90 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz,  $\text{Bz}_{3,5}$ )

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.67$  (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,  $\text{OCH}_3$ ), 116.69 (q, 1 C,  $^1J_{\text{CF}}$  291.4 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 127.53 (1 C,  $\text{C-Bz}_4$ ), 129.09 (2 C,  $\text{CH-Bz}_{2,6}$ ), 130.21 (1 C,  $\text{CH-Bz}$ ), 130.23 (1 C,  $\text{CH-Bz}$ ), 151.58 (1 C,  $\text{C-Bz}_1$ ), 174.06 (1 C,  $\text{COOR}$ ), 179.96 (q, 1 C,  $^2J_{\text{CF}}$  34.8 Hz,  $\text{CF}_3\text{CO}$ )

HRMS : Berechnet für  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{O}_3$  ( $[\text{M}]^+$ ): 358,1756 (ex.), 358,40 (av.)  
Gefunden 358.1824 (41 %)

338 (27 %, [M-HF]<sup>+</sup>), 326 (25 %, [M-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>), 289 (53 %, [M-CF<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 230 (100 %, [M-CF<sub>3</sub>CO-CH<sub>3</sub>OH+H]<sup>+</sup>), 118 (47 %), 97 (31 %), 91 (35 %, [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 90 (36 %), 74 (40 %), 69 (32 %), 55 (21 %)

### 10-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)dekansäure (3)

20,0 g (56 mmol) Ester (2) wurden in 150 ml (3,98 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 500 ml Eiswasser gegeben. Das gebildete farblose Präzipitat wurde abfiltriert und getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel 63-200 µm mit Chloroform/Methanol 15:1 (v/v) als Laufmittel. R<sub>f</sub> (Chloroform) Produkt 0,30.

Ausbeute: 19 g (55 mmol) = 98 % (farblose Nadeln)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.29-1.42 (m, 10 H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.27 (t, 2 H, J<sub>2,3</sub> 7.4 Hz, H-2), 2.61 (t, 2 H, J<sub>9,10</sub> 7.7 Hz, H-10), 7.26 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, Bz<sub>2,6</sub>), 7.91 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, Bz<sub>3,5</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> 291.5 Hz, CF<sub>3</sub>), 127.56 (1 C, C-Bz<sub>4</sub>), 129.12 (2 C, CH-Bz<sub>2,6</sub>), 130.27 (1 C, CH-Bz), 130.29 (1 C, CH-Bz), 151.58 (1 C, C-Bz<sub>1</sub>), 180.23 (1 C, COOH), 180.25 (q, 1 C, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 34.3 Hz, CF<sub>3</sub>C=O),

HRMS : Berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ([M]<sup>+</sup>): 344,159930 (ex.), 344,37 (av.)  
Gefunden: 344.331 (31 %)

326 (10 %, [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 224 (15 %, [M-HF]<sup>+</sup>), 306 (10 %, [M-HF-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 275 (28 %, [M-CF<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 230 (100 %, [M-H<sub>2</sub>O-CF<sub>3</sub>CO+H]<sup>+</sup>), 135 (30 %), 131 (10 %), 118 (25 %, [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>CO]<sup>+</sup>), 91 (40 %, [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 90 (22 %)

**10-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)dekansäure-tert.-butylester (4)**

Zu einer Lösung von 15 g (43,6 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  $\mu\text{m}$  mit Chloroform/Petrolether 7:3 (v/v) als mobile Phase gereinigt.  $R_f$ (Chloroform) = 0,30 (Säure) und  $R_f$  0,56 (Ester).

Ausbeute: 5,6 g (30,7 mmol) = 52 % (gelbes Öl)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.30-1,45 (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 9 H, tBu), 1.53 (m, 2 H, H-3), 1.60 (m, 2 H, H-9), 2.15 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.3 Hz, H-2), 2.64 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 7.29 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.6 Hz,  $\text{Bz}_{2,6}$ ), 7.93 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz,  $\text{Bz}_{3,5}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24.81 (1 C, C-3), 27.94 (3 C, tBu- $\text{CH}_3$ ), 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- $\text{C}_q$ ), 116.69 (q, 1 C,  $^1J_{\text{CF}}$  291.4 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 127.51 (1 C, C- $\text{Bz}_4$ ), 129.07 (2 C, CH- $\text{Bz}_{2,6}$ ), 130.16 (1 C, CH- $\text{Bz}$ ), 130.19 (1 C, CH- $\text{Bz}$ ), 151.62 (1 C, C- $\text{Bz}_1$ ), 172.98 (1 C, COOR), 179.92 (q, 1 C,  $^2J_{\text{CF}}$  34,3 Hz,  $\text{CF}_3\text{CO}$ )

HRMS : Berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{O}_3$  ( $[\text{M-tBu+H}]^+$ ): 344,159  
 Gefunden 404,46 (53 %)  
 Berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{O}_3$  ( $[\text{M}]^+$ ): 404,22253 (ex.), 404,48 (av.)

331 (33 %,  $[\text{M-OtBu}]^+$ ), 188 (35 %  $[\text{CF}_3\text{COPhCH}_3]^+$ ), 116 (15 %,  $[\text{CH}_3\text{COOtBu}]^+$ ), 57 (100 %,  $[\text{tBu}]^+$ )

**10-(p-(1-Hydroxyimino-2,2,2-trifluorethyl)phenyl)dektansäure-tert.-butylester (5)**

Eine Lösung von 10 g (24,7 mmol) Ester (**4**) und 2,1 g (30 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  $\mu\text{m}$  mit Chloroform als Eluent gereinigt. ( $R_f = 0,65$  Keton;  $R_f = 0,2$  Produkt).

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

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.35\text{-}1.47$  (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.46 (s, 9 H, tBu), 1.63 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.24 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.5 Hz, H-2), 2.64 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 7.27 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 7.48 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.1 Hz, Bz), 10.35 (s, 1 H, N-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.91$  (1 C, C-3), 27.91 (3 C, tBu- $\text{CH}_3$ ), 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- $\text{C}_q$ ), 120.81 (q, 1C,  $^1J_{\text{CF}}$  274.7 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 123.52 (1 C, C-Bz $_4$ ), 128.38 (2 C, CH-Bz), 128.57 (2 C, CH-Bz), 145.32 (1 C, Bz $_1$ ), 146.81 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  32.0 Hz, C=N), 174.33 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_3$  ( $[\text{M-tBu+H}]^+$ ): 343,175  
 Gefunden 343,1759 (17 %)  
 Berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{NO}_3$  ( $[\text{M}]^+$ ): 415,2334 (ex.), 415,5 (av.)

342 (85 %,  $[\text{M-OtBu}]^+$ ), 324 (33 %,  $[\text{M-OtBu-H}_2\text{O}]^+$ ), 244 (16 %,  $[\text{F}_3\text{CCNOHPhCH}_3]^+$ ), 226 (10 %,  $[\text{202-H}_2\text{O}]^+$ ), 116 (9 %,  $[\text{CH}_3\text{COOtBu}]^+$ ), 57 (100 %,  $[\text{tBu}]^+$ )

### 10-(p-(1-(*O*-(p-Toluensulfonyl)hydroxyimino)-2,2,2-trifluorethyl)phenyl)-dekansäure-tert.-butylester (6)

In einer Lösung von 5,6 g (13,2 mmol) Oxim (**5**) und 3,8 g (19,8 mmol) p-Toluensulfonylchlorid in 200 ml Aceton wurden 7,3 g (52,8 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  $\mu\text{m}$  mit n-Heptan/Dichlormethan 2:4 (v/v) als mobile Phase gereinigt.  $R_f$  0,18 (Produkt);  $R_f$  0,1 (Oxim);  $R_f$  0,5 (p-Toluensulfonylchlorid).

Ausbeute: 5,5 g (10 mmol) = 75 % (gelbliches Öl)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Bemerkung: Die NMR-Spektren zeigten wie bereits bei den zuvor synthetisierten  $\text{C}_3$ -,  $\text{C}_5$ - und  $\text{C}_7$ -Photosonden<sup>i</sup> zwei Isomere des Produktes (Tosylgruppe cis/trans zum Benzen-Ring). Für anschliessende Reaktion wurde kein Unterschied gemacht und Isomere beide zum Diaziridin umgesetzt.

Die entsprechenden Signale sind in Klammern zusammen angegeben.

$\delta = 1.33\text{-}1.47$  (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), [1.41, 1.42 (s, 9 H, tBu)], 1.58 (m, 4 H, H-3/H-9), [2.17, 2.18 (t, 2 H, H-2,  $J_{\text{HH}}$  7.4 Hz)], [2.43, 2.44 (s, 3 H,  $\text{TosCH}_3$ )], 2.61 (m, 2 H, H-10), {[7.19 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 7.24 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.6 Hz, Bz)], 7.34 (m, 2 H,  $\text{TosCH}$ ), [7.86 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz,  $\text{TosCH}$ ), 7.88 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz,  $\text{TosCH}$ )}

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta =$  [21.70, 21.72 (1 C,  $\text{TosCH}_3$ )], [24.90, 24.92 (1 C, C-3)], 28.06 (3 C, tBu- $\text{CH}_3$ ), 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- $\text{C}_q$ ), [119.67 (q, 1C,  $^1J_{\text{CF}}$  277.7 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 120.19 (q, 1C,  $^1J_{\text{CF}}$  283.8 Hz,  $\text{CF}_3$ )], [121.77, 125.02 (1 C, C-Bz<sub>4</sub>)], [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,  $\text{Tos-C}_4$ )], [145.88, 146.03 (1 C,  $\text{Tos-C}_1$ )], [147.01, 147.19 (1 C, Bz<sub>1</sub>)], [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)

MALDI-TOF-MS : Berechnet für  $([\text{M}+\text{Na}]^+)$ : 592,2321  
Gefunden 592,25 (60 %)  
Berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$  ( $[\text{M}]^+$ ): 569,2423 (ex.), 569,68 (av.)

608,27  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (25%), 592,25  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (60%), 496,22  $[\text{M-t-Bu}+\text{H}]^+$  (50%), 344,31  $[\text{M-C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{-t-Bu}+\text{H}]^+$  (100%)

### 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziridiny)phenyl)dekansäure-tert.-butylester (7)

In einem druckfesten 10 ml Pyrex-Gläschen wurden 1,8 g (2,8 mmol) des Toluensulfonyloxims (**6**) in 5 ml absolutiertem Diethylether anteilig gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden ebenfalls unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff 4 ml (~2 g) Ammoniak einkondensiert. Nach langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur (in einem fest verschlossenen Gefäß) wurde die Mischung über Nacht gerührt. Die Lösung wurde erneut eingefroren und der überschüssige Ammoniak wurde vorsichtig abgedampft. Das ausgefallene p-Toluensulfonamid

<sup>i</sup> Hörschemeyer, J. (1997), Diplomarbeit



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  $\mu\text{m}$  in Chloroform/Essigsäureethylester 7:1 (v/v),  $R_f$  (Produkt) 0,50,  $R_f$  (Edukt) 0,72.

Ausbeute: 1 g (2,4 mmol) = 86 % (hellgelbes Öl).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.30-1.50 (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 9 H, tBu), 1.55 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.15 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.5 Hz, H-2), 2.31 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.6 Hz, NH), 2.58 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 2.75 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.6 Hz, NH), 7.17 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 7.46 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.1 Hz, Bz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24.85 (1 C, C-3), 27.96 (3 C, tBu- $\text{CH}_3$ ), 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- $\text{C}_q$ ), 123.52 (q, 1C,  $^1J_{\text{CF}}$  278.5 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 127.91 (2 C, CH-Bz), 128.61 (2 C, CH-Bz), 128.91 (1 C, C- $\text{Bz}_4$ ), 144.85 (1 C, C- $\text{Bz}_1$ ), 173.06 (1 C, COOR)

MALDI-TOF-MS :	Berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	437,2392
	Gefunden	437,25 (56 %)
	Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ ( $[\text{M}]^+$ ):	414,2494 (ex.), 414,51 (av.)

461,01  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  (10%), 454,21  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (10%), 437,25  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (56%), 414,26  $[\text{M}]^+$  (15%), 342,4  $[\text{M}-\text{t-Bu}+\text{H}]^+$  (55%), 189,15  $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2-\text{t-Bu}+\text{H}]^+$  (100%)

### 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekansäure-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 1,9 g (4,5 mmol) Diaziridin (7) (vereinigte Produkte aus mehreren Synthesen) in 50 ml Diethylether 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 5,4 g (40 mmol) suspendiertem Silberoxid oxidiert. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert, zweimal mit Ether gewaschen und die vereinigten Etherphasen anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Kontrolle über

Dünnschichtchromatographie zeigte ein einziges Produkt, welches ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

$R_f = 0,55$  (Chloroform).

Ausbeute: 1,59 g (4,29 mmol) = 95 % (hellgelbes Öl)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.27\text{-}1.38$  (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.42 (s, 9 H, tBu), 1.57 (m, 4 H, H-3/H-9), 2.17 (t, 2 H,  $J_{2,3}$  7.4 Hz, H-2), 2.58 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 7.07 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 7.17 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.1 Hz, Bz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.92$  (1 C, C-3), 28.05 (3 C, tBu- $\text{CH}_3$ ), 28.33 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  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- $\text{C}_q$ ), 122.19 (q, 1 C,  $^1J_{\text{CF}}$  274.7 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 126.36 (1 C, C-Bz $_4$ ), 126.36 (2 C, CH-Bz), 128.83 (2 C, CH-Bz), 144.57 (1 C, C-Bz $_1$ ), 173.14 (1 C, COOR)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	435,2235
	Gefunden	435,203 (100 %)
	Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ ( $[\text{M}]^+$ ):	412,2337 (ex.), 412,50 (av.)

847,43  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  (10%), 825,44  $[2\text{M}]^+$  (5%), 435,203  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100 %), 407,21  $[\text{M}-\text{N}_2+\text{Na}]^+$ , 357,17  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9+\text{H}]^+$

### 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekansäure (9)

1,5 g (3,6 mmol) Diazirin (**8**) wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst. Dann wurden 2 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: 1,12 g (3,56 mmol) = 99 % (gelbliches Öl)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.28\text{-}1.52$  (m, 10 H,  $\text{CH}_2$ ), 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,  $J_{9,10}$  7.7 Hz, H-10), 7.08 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 7.18 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 10.8-11.2 (b, 1 H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.49$  (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,  $^1J_{CF}$  274.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 126.40 (1 C, C-Bz<sub>4</sub>), 126.40 (2 C, CH-Bz), 128.84 (2 C, CH-Bz), 144.49 (1 C, C-Bz<sub>1</sub>), 180.37 (1 C, COOH)

HRMS : Berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([M]<sup>+</sup>): 356,1712 (ex.), 356,39 (av.)  
Gefunden 356,2 (5 %)

356 [M]<sup>+</sup> (5%), 339 [M-OH]<sup>+</sup> (15 %, ) 328 [M-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100 %), 186 [M-C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (58 %), 151 (15 %), 122 (10 %), 104 (10 %), 91 (5 %, [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>)

### 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekansäure-N-succinimidylester (10)

In einer Lösung von 1 g (2,8 mmol) Säure (9) und 0,35 g (3 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 45 ml Diethylether wurden 0,62 g (3 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (≅ 3 ml aus ~1M Lösung in Dichlormethan) gegeben 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<sub>f</sub> 0,52 (Produkt); R<sub>f</sub> 0,1 (Edukt).

Ausbeute: 1,01 g (2,23 mmol) = 83 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.32-1.51 (m, 10 H, CH<sub>2</sub>), 1.58 (dt, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, J<sub>HH</sub> 15.1 Hz, H-9), 1.71 (dt, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, J<sub>HH</sub> 15.0 Hz, H-3), 2.57 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, H-2), 2.59 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, H-10), 2.75 (s, 4 H, Succ-CH<sub>2</sub>), 7.07 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, Bz<sub>2,6</sub>), 7.17 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, Bz<sub>3,5</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 24.39 (1 C, C-3), 25.52 (2 C, Succ-CH<sub>2</sub>), 28.36 (q, 1 C,  $^2J_{CF}$  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,  $^1J_{CF}$  274.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 126.33 (1 C, C-Bz<sub>4</sub>), 126.35 (2 C, CH-Bz<sub>2,6</sub>), 128.82 (2 C, CH-Bz<sub>3,5</sub>), 144.40 (1 C, C-Bz<sub>1</sub>), 168.56 (1 C, COOR), 169.15 (2 C, Succ-CO)

MALDI-TOF-MS: Berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 476,1773  
Gefunden 476,19 (43 %)  
Berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 453,1875 (ex.), 453,46 (av.)

492,21 [M+K]<sup>+</sup> (12 %), 476,19 [M+Na]<sup>+</sup> (100 %), 453,16 [M]<sup>+</sup> (10%), 448,18 [M+Na-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (43 %), 361,94 [M+Na-OSucc]<sup>+</sup> (18%), 338,27 [M+Na-OSucc]<sup>+</sup> (10 %), 334,62 [M+Na-COOSucc]<sup>+</sup> (8 %), 311,25 [M-COOSucc+H]<sup>+</sup> (12 %)

### 5.3.2 Synthese der radioaktiven Biotinlabel

#### 4-Biotinamidobuttersäure (11)

4,5 mg (43,5  $\mu\text{mol}$ )  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) werden mit 0,7 mg (6,5  $\mu\text{mol}$ ) radioaktiver GABA ( $\approx 100 \mu\text{Ci}$ ) versetzt und unter leichtem Erwärmen bei Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1 M wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in 500  $\mu\text{l}$  DMF gelöst. Dadurch erhält man eine GABA-Lösung mit einer spezifischen Radioaktivität von 2 Ci/mol. 45,0 mg (130,8  $\mu\text{mol}$ ) Biotin-N-Hydroxysuccinimid werden in 500  $\mu\text{l}$  DMF aufgenommen und unter Rühren zur GABA-Lösung zugefügt. Die Abtrennung von Natriumionen erfolgt über Kationenaustauscher SP-Sephadex C-25 Pyr<sup>+</sup>. Die eluierten Produkte werden im Vakuum eingeeengt und über Kieselgelsäule mit einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / Wasser / Eisessig, 80:20:1:1, v/v/v/v gereinigt.

$R_f$ -Wert (Produkt) 0,21

Ausbeute: 14,8 mg (45  $\mu\text{mol}$ ) = 90 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.27 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.1 Hz,  $J_{\text{HH}}$  13.5 Hz, H-9), 1.44 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.1 Hz,  $J_{\text{HH}}$  13.5 Hz, H-9'), 1.47 (m, 2 H, H-11), 1.79 (m, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.4 Hz,  $J_{\text{HH}}$  15.1 Hz, H-10), 1.91 (m, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.7 Hz,  $J_{\text{HH}}$  15.0 Hz, H-18), 1.98 (m, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.4 Hz, H-12), 2.28 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.7 Hz, H-19), 2.43 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  13.95 Hz, H-8), 2.53 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  13.95 Hz, H-8'), 2.95 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  5.6 Hz, H-2), 3.23 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.6 Hz, H-17), 4.21 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  4.5 Hz, H-3), 4.29 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  6.6 Hz, H-7), 6.19 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  1.5 Hz, H-4), 6.23 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  1.5 Hz, H-6), 6.19 (s, 1 H, H-16)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	352,1307
	Gefunden	352,2
	Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} [\text{M}]^+$ :	329,1409

374,18  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ , 368,12  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (12 %), 352,20  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100 %), 330,16  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (10%)

Desweiteren wurde nach einer anderen Synthesevorschrift<sup>i</sup> eine 4-Biotinamidobuttersäure mit einer spezifischen Radioaktivität von 15,5 Ci/mol

<sup>i</sup> Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1987), Methods in Enzymology

dargestellt. Dieses Derivat wurde für die Synthese des 4-Biotinamidobuttersäure-N-succinimidylester verwendet.

50 mg (146,5  $\mu\text{mol}$ ) D-Biotin-succinimidylester und 12 mg (116,4  $\mu\text{mol}$ )  $\gamma$ -Aminobuttersäure wurden in 1 ml Chloroform/Methanol, 1:1, v/v gelöst und mit 25  $\mu\text{l}$  N-Ethyldiisopropylamin versetzt. Unter Argon wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit 800  $\mu\text{l}$  Eisessig versetzt. Die Suspension wurde kräftig geschüttelt, für 10 min ultrabeschallt und anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Der gefrorenen Probe wurde ähnlich einer Gefriertrocknung im Vakuum das Lösungsmittel entzogen. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Als Laufmittel diente hierbei ein Lösungsmittelgemisch aus Chloroform:Methanol:2,5 M Ammoniak, 60:40:9, v/v/v.

R<sub>f</sub>-Wert (Produkt): 0,3

Ausbeute: 26,7 mg (81,1  $\mu\text{mol}$ ) = 69 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.27 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, J<sub>HH</sub> 13.5 Hz, H-9), 1.44 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, J<sub>HH</sub> 13.5 Hz, H-9'), 1.47 (m, 2 H, H-11), 1.79 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, J<sub>HH</sub> 15.1 Hz, H-10), 1.91 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, J<sub>HH</sub> 15.0 Hz, H-18), 1.98 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, H-12), 2.28 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, H-19), 2.43 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 13.95 Hz, H-8), 2.53 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 13.95 Hz, H-8'), 2.95 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 5.6 Hz, H-2), 3.23 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, H-17), 4.21 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 4.5 Hz, H-3), 4.29 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, H-7), 6.19 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 1.5 Hz, H-4), 6.23 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 1.5 Hz, H-6), 6.19 (s, 1 H, H-16)

HRMS : Berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S ([M]<sup>+</sup>): 329,1409 (ex.), 329,41 (av.)  
Gefunden: 329,02 (12 %)

352 [M+Na]<sup>+</sup> (60%), 330 [M+H]<sup>+</sup> (10%), 242 [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>COOH]<sup>+</sup> (20%), 227 [M-GABA]<sup>+</sup> (100%)

#### 4-Biotinamidobuttersäure-N-succinimidylester (12)

7,2 mg (22  $\mu\text{mol}$ ) Biotin-[1-<sup>14</sup>C]-C<sub>4</sub>-Säure (spez. Radioaktivität 15,5 Ci/mol) werden mit 3 mg (26  $\mu\text{mol}$ ) N-Hydroxysuccinimid und 5,4 mg (26  $\mu\text{mol}$ ) DCC in 500  $\mu\text{l}$  trockenem DMF gelöst. Nach 12 h Rühren bei 35 °C wird das Lösungsmittel im

Vakuum verdampft und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform / Methanol / Wasser, 75:20:3, v/v/v).

R<sub>f</sub> (Produkt): 0,24

Ausbeute: 1,9 mg (4,4 μmol) = 20 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.25 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, J<sub>HH</sub> 13.5 Hz, H-9), 1.44 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, J<sub>HH</sub> 13.5 Hz, H-9'), 1.47 (m, 2 H, H-11), 1.79 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, J<sub>HH</sub> 15.1 Hz, H-10), 1.99 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.26 Hz, H-12), 2.03 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, H-12), 2.28 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, H-19), 2.43 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.88 Hz, J<sub>HH</sub> 13.95 Hz, H-8), 2.45 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-19), 2.53 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.88 Hz, J<sub>HH</sub> 13.95 Hz, H-8'), 2.79 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.5 Hz, H-24), 2.89 (m, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.5 Hz, H-25), 2.95 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 5.6 Hz, H-2), 3.23 (t, 2 H, J<sub>HH</sub> 5.4 Hz, H-17), 4.21 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, H-3), 4.29 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, H-7), 4.74 (d, 1 H, H-16), 6.19 (s, 1 H, J<sub>HH</sub> 1.5 Hz, H-4), 6.23 (s, 1 H, H-16)

HRMS : Berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S ([M]<sup>+</sup>): 426,1573 (ex.), 426,49 (av.)  
Gefunden: 426,22 (31 %)

449 [M+Na]<sup>+</sup> (20%), 427 [M+H]<sup>+</sup> (20%), 329 [M-Succinimid]<sup>+</sup> (100%), 227 [M-GABA-Succinimid]<sup>+</sup> (60%)

### 5.3.3 Synthese der Gangliosidderivaten

Natürliches GM1 enthält in seinem Sphingoidteil Fettsäuren der Kettenlänge C-18 und C-20. Für die massenspektrometrischen Untersuchungen werden diese als [M] für C<sub>18</sub> und [M'] für C<sub>20</sub> bezeichnet.

#### Monodeacetyl-lysoGM1 (13)

4,5 g (80 mmol) KOH werden in 100 ml Methanol (Ar-gesättigt) gelöst. Zu 15 ml dieser 0,8 M Lösung werden 100 mg (64,6 μmol) GM1 gegeben. Die Lösung wird 20 h bei 100 °C gerührt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wird mit Eisessig ein pH-Wert von 5 eingestellt. Durch Ausschütteln mit einer kleinen Menge Hexan werden überschüssige Fettsäuren entfernt. Die methanolische Phase wird abgetrennt und die Hexanphase mehrmals mit 5 ml Wasser gewaschen. Die wässrige und

methanolische Phase werden vereinigt und im Vakuum von Lösungsmittelresten befreit. Anschließend wird der Rückstand über RP18 entsalzt und im Vakuum am Rotationsverdampfer eingengt.

Eine Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch über Kieselgelplatte mit einem Laufmittel aus Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:40:9, v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,08.

Ausbeute: 75 mg (59,3 μmol) = 91 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 1:1, v/v): Sphingosin: δ = 0.88 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.12 (m, 2 H, H-6), 3.42 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.52 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, H-1), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.97 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-4), 5.21 (m, 1 H, H-5); Glukose (I): 4.18 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H-1); Galaktose (II): δ = 4.29 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV): δ = 4.85 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl: δ = 1.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.97 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, H-1); Sialinsäure: δ = 3.42 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1259,5871
	Gefunden	1259,54 (15 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1287,6184
	Gefunden	1287,67 (15 %)
	Berechnet für C <sub>53</sub> H <sub>95</sub> N <sub>3</sub> O <sub>29</sub> [M]:	1236,5973 (ex.), 1237,33 (av.)
	Berechnet für C <sub>55</sub> H <sub>99</sub> N <sub>3</sub> O <sub>29</sub> [M']:	1264,6286 (ex.), 1265,39 (av.)

1341,40 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (5%), 1310,62 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (40%), 1282,38 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (33%), 1266,60 [M'+H]<sup>+</sup> (45%), 1238,52 [M+H]<sup>+</sup> (50%), 1055,51 [M-(deacNANA)+K]<sup>+</sup> (22%), 1039,50 [M'-(deacNANA)+Na]<sup>+</sup> (100%), 1011,52 [M-(deacNANA)+Na]<sup>+</sup> (100%)

### Monodeacetyl-N-stearoyl-lysoGM1 („C<sub>18</sub>-GM1-deacetyl“) (14)

20 mg (16,2 μmol) Monodeacetyl-LysoGM1 werden in 200 μl DMF und 20 μl Hünigbase aufgenommen und im Stickstoffstrom eingengt. Dieser Vorgang wird 2 mal wiederholt. Das so vorbereitete Edukt wird in 500 μl DMF gelöst. Anschließend werden 5,5 mg (14,6 μmol) Stearoyl-NHS hinzugegeben und man lässt diese Lösung

über Nacht bei 30 °C stehen. Man überprüft durch Kieselgel-DC-Kontrolle den Fortschritt der Reaktion. Laufmittel sind hierbei als Test für noch nicht umgesetztes Monodeacetyl-LysoGM1 Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:40:9, v/v/v. Noch nicht umgesetzte Fettsäuren können durch ein Laufmittel aus Chloroform / Methanol / Eisessig, 50:1:0,1, v/v/v detektiert werden. Gegebenenfalls wird eine weitere, kleine Menge an Stearoyl-NHS zugesetzt und erneut stehengelassen. Das Produkt wird säulenchromatographisch über Kieselgel mit einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:40:9, v/v/v gereinigt.

R<sub>f</sub>-Wert (Produkt): 0,13

Ausbeute: 7,5mg (5 µmol) = 34 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 1:1, v/v): Sphingosin: δ = 0.87 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.02 (m, 2 H, H-6), 2.93 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, H-1), 4.33 (m, 1 H, H-2), 5.44 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-4), 5.69 (m, 1 H, H-3), 5.71 (m, 1 H, H-5); Stearinsäure: δ = 0.88 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.22-1.34 (m, 32 H, 5 CH<sub>2</sub>), 1.46 (m, 2 H, H-2), 2.45 (m, 2 H, H-1); Glukose (I): 4.28 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H-1); Galaktose (II): 4.39 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV): 4.35 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl: 1.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.77 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, H-1); Sialinsäure: δ = 3.77 (m, 4 H, H-8/H-9), 5.12 (m, 2 H, H-7)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1526,8558
	Gefunden	1526,52 (10 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1554,8872
	Gefunden	1554,67 (20 %)
	Berechnet für C <sub>71</sub> H <sub>129</sub> N <sub>3</sub> O <sub>30</sub> [M]:	1502,8581 (ex.),
		1503,80 (av.)
	Berechnet für C <sub>73</sub> H <sub>133</sub> N <sub>3</sub> O <sub>30</sub> [M']:	1530,8896 (ex.),
		1531,85 (av.)

1593,94 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (5%), 1576,78 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (33%), 1570,72 [M'+K]<sup>+</sup>  
 1554,67 [M'+Na]<sup>+</sup> (20%), 1526,52 [M+Na]<sup>+</sup> (10%), 1532,88 [M'+H]<sup>+</sup> (5%),  
 1504,85 [M+H]<sup>+</sup> (7%)



**Monodeacetyl-N-octanoyl-lysoGM1 („C<sub>8</sub>-GM1-deacetyl“) (15)**

49,4 mg (40  $\mu$ mol) Monodeacetyl-LysoGM1 werden in einer Mischung von 500  $\mu$ l DMF/Pyridin (10:1, v/v) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung gibt man eine katalytische Menge an 4-Dimethylaminopyridin (Steglich-Base). Man löst 8,5 mg (32  $\mu$ mol) 4-Nitrophenylcaprylat in 200  $\mu$ l DMF diese Lösung zum Monodeacetyl-LysoGM1. Anschließend lässt man über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:40:9, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein weiterer Zusatz von 4-Nitrophenylcaprylat erfolgen. Der Abbruch der Reaktion sollte erfolgen, wenn ca. 80 % C<sub>8</sub>-GM1-deacetyl entstanden sind, da sonst die Gefahr einer Mehrfach-Acylierung besteht. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittelgradienten von Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:40:9, v/v/v nach Chloroform / Methanol / 2,5 M NH<sub>3</sub>, 60:35:8, v/v/v.

R<sub>f</sub>-Wert (Produkt): 0,11

Ausbeute: 18,0 mg (13  $\mu$ mol) = 33 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 1:1, v/v): Sphingosin:  $\delta$  = 0.87 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.02 (m, 2 H, H-6), 2.93 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, H-1), 4.33 (m, 1 H, H-2), 5.44 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-4), 5.69 (m, 1 H, H-3), 5.71 (m, 1 H, H-5); Oktansäure:  $\delta$  = 0.91 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 10 H, 5 CH<sub>2</sub>), 2.22 (m, 2 H, H-2); Glukose (I):  $\delta$  = 4.28 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.39 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.35 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl:  $\delta$  = 1.97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.77 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, H-1); Sialinsäure:  $\delta$  = 3.71 (m, 4 H, H-8/H-9), 5.14 (m, 2 H, H-7)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1386,6994
	Gefunden	1386,34 (18 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1414,7307
	Gefunden	1414,74 (30 %)
	Berechnet für C <sub>71</sub> H <sub>129</sub> N <sub>3</sub> O <sub>30</sub> [M]:	1363,7096 (ex.), 1364,54 (av.)
	Berechnet für C <sub>73</sub> H <sub>133</sub> N <sub>3</sub> O <sub>30</sub> [M']:	1391,7409 (ex.), 1392,59 (av.)

1452,26 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (7%), 1424,22 [M+Na+K-H]<sup>+</sup> (5%), 1436,75 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (33%), 1430,74 [M'+K]<sup>+</sup> (25%), 1408,25 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (10%), 1402,22

$[M+K]^+$  (20%), 1393,58  $[M'+H]^+$  (12%), 1365,43  $[M+H]^+$  (17%), 1165,3  $[M-(\text{deacNANA})+Na]^+$  (50%), 1137,32  $[M-(\text{deacNANA})+Na]^+$  (60%)

### 5.3.4 Synthese der photoaktivierbaren Gangliosidderivaten

#### Monodeacetyl-(5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1 (16)

0,1 g (80  $\mu\text{mol}$ ) Monodeacetyl-LysoGM1 (**13**) werden in einer Mischung von 1 ml DMF/*N*-Ethyldiisopropylamin (100:1, v/v) gelöst. Man löst 0,038 g (80  $\mu\text{mol}$ ) 5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentansäure-*N*-succinimidylester (**12**) in 200  $\mu\text{l}$  DMF und gibt diese Lösung zum Monodeacetyl-LysoGM1. Anschließend lässt man über Nacht auf Raumtemperatur rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:40:9, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein weiterer Zusatz des Succinimidylesters erfolgen. Der Abbruch der Reaktion sollte erfolgen, wenn ca. 80 % TPD- $\text{C}_5$ -GM1-deacetyl entstanden sind. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittelgradienten von Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:40:9, v/v/v nach Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:35:8, v/v/v.

$R_f$  (Produkt) = 0,4.

Ausbeute: 110 mg (66  $\mu\text{mol}$ ) = 83 % (farbloser Feststoff)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Sphingosin:  $\delta$  = 0.88 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  6.6 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13  $\text{CH}_2$ ), 2.12 (m, 2 H, H-6), 3.42 (m, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 3.52 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz,  $J_{\text{HH}}$  5.1 Hz, H-1), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.97 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.5 Hz, H-4), 5.21 (m, 1 H, H-5); Glukose (I): 4.18 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.29 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.85 (m, 1 H, H-1); Galaktose-*N*-acetyl:  $\delta$  = 1.67 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.97 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.3 Hz, H-1); TPD-Pentansäure:  $\delta$  = 1.45-1.68 (m, 6 H, H-2/H-3/H-4), 1.60 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.48 (t, 2 H,  $J_{12}$  7.4 Hz, H-1), 2.69 (t, 2 H, H-5), 6.88 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 8.11 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für $[M+Na]^+$ :	1528,6772
	Gefunden	1528,64 (16 %)
	Berechnet für $[M'+Na]^+$ :	1556,7085
	Gefunden	1556,72 (22 %)
	Berechnet für $\text{C}_{66}\text{H}_{106}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_{30}$ [M]:	1505,6875 (ex.),

	1506,58 (av.)
Berechnet für $C_{68}H_{110}F_3N_5O_{30}$ [M']:	1533,7188 (ex.),
	1534,63 (av.)

1595,71 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (11%), 1579,60 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (6%), 1567,65 [M+Na+K-H]<sup>+</sup> (15%), 1556,72 [M'+Na]<sup>+</sup> (22%), 1551,55 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (100%), 1528,64 [M+Na]<sup>+</sup> (16%), 1535,22 [M'+H]<sup>+</sup> (12%), 1507,22 [M+H]<sup>+</sup> (22%),

### N-5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1 (17)

0,015 g (10  $\mu$ mol) Monodeacetyl-(5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)-pentansäure)-GM1 (**16**) werden in 200  $\mu$ l DMF aufgenommen, welches vorher mit N-Ethyl-diisopropylamin von flüchtigen amino- und iminohaltigen Komponenten befreit wurde. Dazu gibt man bei Raumtemperatur Acetanhydrid im Überschuss. Anschließend lässt man über Nacht auf Raumtemperatur rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O, 50:50:10, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein weiterer Zusatz von Acetanhydrid erfolgen. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O, 50:50:10, v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,54

Ausbeute: 4,65 mg (3  $\mu$ mol) = 30 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Sphingosin:  $\delta$  = 0.88 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.12 (m, 2 H, H-6), 3.42 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.52 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, H-1), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.97 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-4), 5.21 (m, 1 H, H-5); Glukose (I): 4.18 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.29 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.85 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl:  $\delta$  = 1.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.97 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, H-1); Sialinsäure:  $\delta$  = 1.9 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>); TPD-Pentansäure:  $\delta$  = 1.45-1.68 (m, 6 H, H-2/H-3/H-4), 1.60 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.48 (t, 2 H, J<sub>12</sub> 7.4 Hz, H-1), 2.69 (t, 2 H, H-5), 6.88 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, Bz), 8.11 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, Bz)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1570,6878
	Gefunden	1570,42 (25 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1598,7191
	Gefunden	1598,75 (20 %)
	Berechnet für $C_{68}H_{108}F_3N_5O_{31}$ [M]:	1547,6980 (ex.),

	1548,62 (av.)
Berechnet für $C_{70}H_{126}F_3N_5O_{31}$ [ $M'$ ]:	1575,7293 (ex.),
	1576,67 (av.)

1637,74 [ $M'+Na+K-H$ ]<sup>+</sup> (11%), 1620,63 [ $M'+2Na-H$ ]<sup>+</sup> (60%), 1615,57 [ $M+3Na-2H$ ]<sup>+</sup> (5%), 1609,96 [ $M+Na+K-H$ ]<sup>+</sup> (8%), 1598,75 [ $M'+Na$ ]<sup>+</sup> (20%), 1593,60 [ $M+2Na-H$ ]<sup>+</sup> (55%), 1570,52 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup> (25%), 1577,22 [ $M'+H$ ]<sup>+</sup> (100%), 1549,12 [ $M+H$ ]<sup>+</sup> (87%)

### Radioaktives 5-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)pentanoyl-lysoGM1 (17)

Die Darstellung von radioaktiv markiertem  $C_5$ -TPD-GM1 erfolgte analog mit 500  $\mu$ Ci [ $1-^{14}C$ ]-Acetanhydrid (spez. Radioaktivität 114 Ci/mol). Da das verwendete [ $1-^{14}C$ ]-Acetanhydrid zu mehr als 90% isotopenrein war, sollten bei den massenspektrometrischen Untersuchungen die entsprechenden Peaks eine um 2 amu erhöhte Masse zeigen. Dieses war in der Tat der Fall.

Auf Grund der hohen Radioaktivität konnten hierbei keine NMR- Spektren angefertigt werden.

Der Stern \* zeigt die radioaktive Markierung mit [ $1-^{14}C$ ]-Acetanhydrid an.

$R_f$  (Produkt) = 0,54

Ausbeute: 3,10 mg (2  $\mu$ mol) = 20 % (farbloser Feststoff)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [ $M^*+Na$ ] <sup>+</sup> :	1572,6878
	Gefunden	1572,14 (24 %)
	Berechnet für [ $M^{*'}+Na$ ] <sup>+</sup> :	1600,7191
	Gefunden	1600,65 (13 %)
	Berechnet für $C_{68}H_{108}F_3N_5O_{31}$ [ $M^*$ ]:	1549,6980 (ex.),
		1550,62 (av.)
	Berechnet für $C_{70}H_{126}F_3N_5O_{31}$ [ $M^{*'}$ ]:	1577,7293 (ex.),
		1578,67 (av.)

### Monodeacetyl-(10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekanoyl-lysoGM1 (18)

0,1 g (80  $\mu$ mol) Monodeacetyl-LysoGM1 (13) werden in einer Mischung von 1 ml DMF/N-Ethyl-diisopropylamin (100:1, v/v) gelöst. Man löst 0,038 g (80  $\mu$ mol) 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekansäure-N-succinimidylester (10) in 200  $\mu$ l DMF und gibt diese Lösung zum Monodeacetyl-LysoGM1. Anschließend lässt man über

Nacht auf Raumtemperatur rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:40:9, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein weiterer Zusatz von Succinimidylesters (**10**) erfolgen. Der Abbruch der Reaktion sollte erfolgen, wenn ca. 80 % TPD- $\text{C}_{10}$ -GM1-deacetyl entstanden sind. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittelgradienten von Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:40:9, v/v/v nach Chloroform / Methanol / 2,5 M  $\text{NH}_3$ , 60:35:8, v/v/v.

$R_f$  (Produkt) = 0,27.

Ausbeute: 110 mg (68  $\mu\text{mol}$ ) = 83 % (farbloser Feststoff)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  1:1, v/v): Sphingosin:  $\delta$  = 0.88 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  6.6 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13  $\text{CH}_2$ ), 2.12 (m, 2 H, H-6), 3.42 (m, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 3.52 (m, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz,  $J_{\text{HH}}$  5.1 Hz, H-1), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.97 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.5 Hz, H-4), 5.21 (m, 1 H, H-5); Glukose (I): 4.18 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.29 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.85 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl:  $\delta$  = 1.67 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.97 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.3 Hz, H-1); TPD-Dekansäure:  $\delta$  = 1.25-1.45 (m, 14 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.79 (m, 2 H, H-9), 2.50 (m, 2 H, H-1), 2.54 (t, 2 H,  $J_{9,10}$  7.6 Hz, H-10), 6.88 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz), 8.11 (d, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  8.4 Hz, Bz)

ESI-TOF-MS:	Berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	1598,7555
	Gefunden	1598,74 (8 %)
	Berechnet für $[\text{M}'+\text{Na}]^+$ :	1626,7868
	Gefunden	1626,77 (10 %)
	Berechnet für $\text{C}_{71}\text{H}_{116}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_{30}$ [M]:	1575,7657 (ex.), 1576,71 (av.)
	Berechnet für $\text{C}_{73}\text{H}_{120}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_{30}$ [M']:	1603,797 (ex.), 1604,77 (av.)

1670,76  $[\text{M}'+3\text{Na}-2\text{H}]^+$  (23%), 1664,71  $[\text{M}'+\text{Na}+\text{K}-\text{H}]^+$  (11%), 1648,76  $[\text{M}'+2\text{Na}-\text{H}]^+$  (60%), 1642,72  $[\text{M}+3\text{Na}-2\text{H}]^+$  (23%), 1636,71  $[\text{M}+\text{Na}+\text{K}-\text{H}]^+$  (5%), 1626,77  $[\text{M}'+\text{Na}]^+$  (10%), 1620,74  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  (51%), 1598,74  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (8%), 824,88  $[\text{M}'+2\text{Na}]^{2+}$  (100%), 810,87  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  (70%), 425,33  $[\text{M}'+4\text{Na}]^{4+}$  (10%), 397,29 (10%)  $[\text{M}+4\text{Na}]^{4+}$

**N-10-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyl)phenyl)dekanoyl-lysoGM1 (19)**

0,01 g (6  $\mu$ mol) Monodeacetyl-(10-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyl)phenyl)dekan säure)-GM1 (**18**) werden in 1 ml DMF aufgenommen, welches vorher mit N-Ethyl-diisopropylamin von flüchtigen amino- und iminohaltigen Komponenten befreit wurde. Dazu gibt man bei Raumtemperatur Acetanhydrid. Anschließend lässt man über Nacht auf Raumtemperatur rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O, 50/50/10, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein weiterer Zusatz von Acetanhydrid erfolgen. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O, 50:50:10, v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,49.

Ausbeute: 4 mg (2,5  $\mu$ mol) = 42 % (farbloser Feststoff)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 400 MHz, CDCl<sub>3</sub> 1:1, v/v): Sphingosin:  $\delta$  = 0.88 (t, 3 H, J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.12 (m, 2 H, H-6), 3.42 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.52 (m, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, H-1), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.97 (dd, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, H-4), 5.21 (m, 1 H, H-5); Glukose (I): 4.18 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.29 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.85 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl:  $\delta$  = 1.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.97 (d, 1 H, J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, H-1); Sialinsäure:  $\delta$  = 1.9 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>); TPD-Dekansäure:  $\delta$  = 1.25-1.45 (m, 14 H, CH<sub>2</sub>), 1.79 (m, 2 H, H-9), 2.50 (m, 2 H, H-1), 2.54 (t, 2 H, J<sub>9,10</sub> 7.6 Hz, H-10), 6.88 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, Bz), 8.11 (d, 2 H, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, Bz)

ESI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1640,7661
	Gefunden	1640,22 (10 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1668,7974
	Gefunden	1668,66 (10 %)
	Berechnet für C <sub>73</sub> H <sub>118</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>31</sub> [M]:	1617,7763 (ex.), 1618,75 (av.)
	Berechnet für C <sub>75</sub> H <sub>122</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>31</sub> [M']:	1645,8076 (ex.), 1646,80 (av.)

1713,82 [M'+3Na-2H]<sup>+</sup> (20%), 1708,41 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (8%), 1690,92 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (60%), 1685,36 [M+3Na-2H]<sup>+</sup> (25%), 1679,96 [M+Na+K-H]<sup>+</sup> (15%), 1668,66 [M'+Na]<sup>+</sup> (10%), 1663,70 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (40%), 1640,22 [M+Na]<sup>+</sup> (10%), 845,88 [M'+2Na]<sup>2+</sup> (80%), 831,88 [M+2Na]<sup>2+</sup> (100%), 427,68 [M+4Na]<sup>4+</sup> (8%)

**Radioaktives 10-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)dekanoyl-lysoGM1 (19)**

Die Darstellung von radioaktiv markiertem C<sub>5</sub>-TPD-GM1 erfolgte analog mit 500  $\mu$ Ci [1-<sup>14</sup>C]-Acetanhydrid (spez. Radioaktivität 114 Ci/mol). Da das verwendete [1-<sup>14</sup>C]-Acetanhydrid zu mehr als 90% isotopenrein war, sollten bei den massenspektrometrischen Untersuchungen die entsprechenden Peaks eine um 2 amu erhöhte Masse zeigen. Auch hier konnten diese gefunden werden.

Auf Grund der hohen Radioaktivität konnten hierbei keine NMR- Spektren angefertigt werden.

Der Stern \* zeigt die radioaktive Markierung mit [1-<sup>14</sup>C]-Acetanhydrid an.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,49.

Ausbeute: 2 mg (1,25  $\mu$ mol) = 20 % (farbloser Feststoff)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M* + Na] <sup>+</sup> :	1642,7661
	Gefunden	1642,47 (15 %)
	Berechnet für [M* + Na] <sup>+</sup> :	1670,7974
	Gefunden	1668,42 (13 %)
	Berechnet für C <sub>73</sub> H <sub>118</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>31</sub> [M*]:	1619,7763 (ex.),
		1620,75 (av.)
	Berechnet für C <sub>75</sub> H <sub>122</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>31</sub> [M*]:	1647,8076 (ex.),
		1648,80 (av.)

**5.3.5 Synthese der Biotin-markierten Gangliosidderivaten****Biotin-[1-<sup>14</sup>C]C<sub>4</sub>-N-stearoyl-lysoGM1 (20)**

7,5 mg (5  $\mu$ mol) C<sub>18</sub>-GM1-deacetyl (**14**) werden mehrmals in 200  $\mu$ l DMF und 20  $\mu$ l Hünigbase aufgenommen und im Stickstoffstrom eingengt. Danach löst man das Edukt in 400  $\mu$ l DMF und 40  $\mu$ l Hünigbase und gibt 2,1 mg (5  $\mu$ mol) 4-Biotinamidobuttersäure-N-succinimidylester hinzu. Die Lösung wird für 2 Tage bei 35 °C gerührt. Nach Reaktionskontrolle durch Kieselgel-DC wird bei schlechter Umsetzung eine gleiche Menge 4-Biotinamidobuttersäure-succinimidylester zugegeben. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch in einem Laufmittel aus Chloroform / Methanol / 30 mM CaCl<sub>2</sub> / 100 mM KCl, 50:50:4:8, v/v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt): 0,43

Ausbeute: 2,35 mg (1,3  $\mu\text{mol}$ ) = 26 % (farbloser Feststoff)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 1:1, v/v): Sphingosin:  $\delta$  = 0.87 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  6.6 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13  $\text{CH}_2$ ), 2.02 (m, 2 H, H-6), 2.93 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz,  $J_{\text{HH}}$  5.1 Hz, H-1), 4.33 (m, 1 H, H-2), 5.44 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.5 Hz, H-4), 5.69 (m, 1 H, H-3), 5.71 (m, 1 H, H-5); Stearinsäure:  $\delta$  = 0.88 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  7.3 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.22-1.34 (m, 32 H, 5  $\text{CH}_2$ ), 1.46 (m, 2 H, H-2), 2.45 (m, 2 H, H-1); Glukose (I): 4.28 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz, H-1); Galaktose (II): 4.39 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV): 4.35 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl: 1.67 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.77 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.3 Hz, H-1); Sialinsäure:  $\delta$  = 3.77 (m, 4 H, H-8/H-9), 5.12 (m, 2 H, H-7); Biotin:  $\delta$  = 2.17 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz, H-19), 2.21 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  6.7 Hz, H-6), 3.18 (m, 2 H, H-3/H-7), 4.54 (m, 2 H, H-8)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	1837,9863
	Gefunden	1838,82 (95 %)
	Berechnet für $[\text{M}'+\text{Na}]^+$ :	1866,0176
	Gefunden	1866,94 (100 %)
	Berechnet für $\text{C}_{85}\text{H}_{150}\text{N}_6\text{O}_{33}\text{S}$ [M]:	1814,9965 (ex.), 1816,21 (av.)
	Berechnet für $\text{C}_{87}\text{H}_{154}\text{N}_6\text{O}_{33}\text{S}$ [M']:	1843,0278 (ex.), 1844,26 (av.)

1910,94  $[\text{M}'+3\text{Na}-2\text{H}]^+$  (12%), 1889,30  $[\text{M}'+2\text{Na}-\text{H}]^+$  (32%), 1882,94  $[\text{M}+3\text{Na}-2\text{H}]^+$  (23%), 1866,94  $[\text{M}'+\text{Na}]^+$  (100%), 1960,98  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  (46%), 1838,82  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (95%), 1844,86  $[\text{M}'+\text{H}]^+$  (8%), 1816,80  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (10%)

### Biotin-[1- $^{14}\text{C}$ ]C<sub>4</sub>-N-octanoyl-lysoGM1 (21)

9 mg (6,6  $\mu\text{mol}$ ) C<sub>8</sub>-GM1-deacetyl werden in 250  $\mu\text{l}$  DMF unter leichtem Erwärmen gelöst. Ebenso werden 3,1 mg (7  $\mu\text{mol}$ ) 4-Biotinamidobuttersäure-N-succinimidylester in 250  $\mu\text{l}$  DMF aufgenommen und beide Lösungen unter Kühlung zusammengegeben. Danach erwärmt man auf Raumtemperatur und lässt über Nacht stehen. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel (Laufmittel: Chloroform / Methanol / Wasser, 60:35:8, v/v/v).

R<sub>f</sub>-Wert (Produkt): 0,52

Ausbeute: 0,85 mg (0,5  $\mu\text{mol}$ ) = 8 % Ausbeute: (farbloser Feststoff)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 1:1, v/v): Sphingosin:  $\delta$  = 0.87 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 26 H, 13 CH<sub>2</sub>), 2.02 (m, 2 H, H-6), 2.93 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz,  $J_{\text{HH}}$  5.1 Hz, H-1), 4.33 (m, 1 H, H-2), 5.44 (dd, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.5 Hz, H-4), 5.69 (m, 1 H, H-3), 5.71 (m, 1 H, H-5); Oktansäure:  $\delta$  = 0.91 (t, 3 H,  $J_{\text{HH}}$  7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.32 (m, 10 H, 5 CH<sub>2</sub>), 2.22 (m, 2 H, H-2); Glukose (I):  $\delta$  = 4.28 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.8 Hz, H-1); Galaktose (II):  $\delta$  = 4.39 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  7.9 Hz, H-1); Galaktose (IV):  $\delta$  = 4.35 (m, 1 H, H-1); Galaktose-N-acetyl:  $\delta$  = 1.97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.77 (d, 1 H,  $J_{\text{HH}}$  8.3 Hz, H-1); Sialinsäure:  $\delta$  = 3.71 (m, 4 H, H-8/H-9), 5.14 (m, 2 H, H-7); Biotin:  $\delta$  = 2.17 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  7.6 Hz, H-19), 2.21 (t, 2 H,  $J_{\text{HH}}$  6.7 Hz, H-6), 3.18 (m, 2 H, H-3/H-7), 4.54 (m, 2 H, H-8)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1697,8297
	Gefunden	1698,22 (100 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1725,1611
	Gefunden	1725,66 (80 %)
	Berechnet für C <sub>75</sub> H <sub>130</sub> N <sub>6</sub> O <sub>33</sub> S [M]:	1674,8399 (ex.),
		1675,94 (av.)
	Berechnet für C <sub>77</sub> H <sub>134</sub> N <sub>6</sub> O <sub>33</sub> S [M']:	1702,1713 (ex.),
		1703,99 (av.)

1764,41 [M'+Na+K-H]<sup>+</sup> (6%), 1747,98 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (44%), 1741,92 [M+3Na-2H]<sup>+</sup> (12%), 1725,66 [M'+Na]<sup>+</sup> (80%), 1719,80 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (40%), 1698,22 [M+Na]<sup>+</sup> (100%), 1704,67 [M+H]<sup>+</sup> (60%), 1676,45 [M+H]<sup>+</sup> (60%)

### 5.3.6 Synthese der NBD-markierten Gangliosidderivaten

#### Monodeacetyl-(6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-hexanoyl-lysoGM1 (22)

25 mg (20  $\mu$ mol) Monodeacetyl-lysoGM1 (**13**) werden in 1 ml DMF aufgenommen. Dazu gibt man bei 10  $\mu$ l N-Ethyl-diisopropylamin und engt im Stickstoffstrom ein. Der Rückstand wird erneut in 0,5 ml DMF aufgenommen und mit 10  $\mu$ mol N-Succinimidyl-6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-hexansäure versetzt. Anschließend lässt man über Nacht bei 40°C rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / 2,5M NH<sub>3</sub>, 60/35/8, v/v/v. Nach Beseitigung des

Lösungsmittels erfolgt die Reinigung säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / 2,5M NH<sub>3</sub>, 60/35/8, v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,1

Ausbeute: 30 mg (19,8 μmol) = 99 % (gelber Feststoff)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1536,6799
	Gefunden	1536,83 (75 %)
	Berechnet für [M'+Na] <sup>+</sup> :	1564,7113
	Gefunden	1564,82 (80 %)
	Berechnet für C <sub>65</sub> H <sub>107</sub> N <sub>7</sub> O <sub>33</sub> [M]:	1513.6909 (ex.)
		1514.59 (av.)
	Berechnet für C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>7</sub> O <sub>33</sub> [M']:	1541.7223 (ex.)
		1542.65 (av.)

1586,89 [M'+2Na-H]<sup>+</sup> (12 %), 1575,52 [M+Na+K-H]<sup>+</sup> (22 %), 1559,56 [M+2Na-H]<sup>+</sup> (18 %), 1582,01 [M'+K]<sup>+</sup> (5%), 1553,73 [M+K]<sup>+</sup> (12 %), 1564,82 [M'+Na]<sup>+</sup> (80 %), 1536,83 [M+Na]<sup>+</sup> (75 %), 1543,23 [M'+H]<sup>+</sup> (60 %), 1515,31 [M+H]<sup>+</sup> (100 %)

### 6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-hexanoyl-lysoGM1 (23)

0,01 g (6,5 μmol) Monodeacetyl-(6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-hexan)-GM1 (**22**) werden in 50 μl DMF aufgenommen. 1 mg Acetanhydrid wird in 100 μl DMF suspendiert und unter Rühren zum Ansatz gegeben. Anschließend lässt man über Nacht auf Raumtemperatur rühren und prüft den Fortschritt der Umsetzung mittels Kieselgel-DC-Kontrolle. Als Laufmittel dient hierbei ein Gemisch von Chloroform / Methanol / 2,5M NH<sub>3</sub>, 60/35/9, v/v/v. Je nach Umsatz kann ein Zusatz von Acetanhydrid erfolgen. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel in einem Laufmittel von Chloroform / Methanol / 2,5M NH<sub>3</sub>, 60/35/9, v/v/v.

R<sub>f</sub> (Produkt) = 0,21

Ausbeute: 10 mg (6,4 μmol) = 98 % (gelber Feststoff)

MALDI-TOF-MS:	Berechnet für [M+Na] <sup>+</sup> :	1578,6913
	Gefunden	1578,83 (87 %)

Berechnet für $[M' + Na]^+$ :	1606,7226
Gefunden	1606,63 (55 %)
Berechnet für $C_{67}H_{109}N_7O_{34}$ [M]:	1555,7015 (ex.)
	1556,63 (av.)
Berechnet für $C_{69}H_{129}N_7O_{34}$ [M']:	1583,7328 (ex.)
	1584,68 (av.)

1645,66  $[M + Na + K - H]^+$  (13 %), 1629,58  $[M' + 2Na - H]^+$  (9 %), 1617,63  $[M + Na + K - H]^+$  (32 %), 1601,58  $[M + 2Na - H]^+$  (18 %), 1623,82  $[M' + K]^+$  (11%), 1595,43  $[M + K]^+$  (21 %), 1606,63  $[M' + Na]^+$  (55 %), 1578,83  $[M + Na]^+$  (87 %), 1585,61  $[M' + H]^+$  (86 %), 1557,42  $[M + H]^+$  (100 %)

## 6 *Literatur*

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell. *Garland Science* **4<sup>th</sup> Ed.**: 742ff.
- Albrecht, B. (1991) Synthese von markierten Glykosphingolipiden und Untersuchung ihres Transportes und Stoffwechsels in kultivierten Zellen. *Dissertation*, Universität Bonn
- Albrecht, B., Pütz, U. und Schwarzmann, G. (1995) Synthesis of fluorescent and radioactive analogues of two lactosylceramides and glucosylceramide containing  $\beta$ -thioglycosidic bonds that are resistant to enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* **276**: 289-308
- Albrecht, B. (1996) NBD-Ceramide mit unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge: Synthese, Inkorporation und Stoffwechselprodukte in Fibroblasten. *Diplomarbeit*, Universität Bonn
- Albrecht, B., Pohlentz, G., Sandhoff, K. und Schwarzmann, G. (1997) Synthesis and mass spectrometric characterization of dioxigenin and biotin labeled ganglioside GM and their uptake by metabolism in cultured cells. *Chem. Phys. Lipids* **86**, 37-50
- Amidon, B., Brown, A. und Waite, M. (1996) Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycerol)phosphate. *Biochemistry* **35**: 13995-14002
- Anderson, R.G.W. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 199-225
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. und Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**: 1373-1387
- 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
- Bradová V., Šmíd F., Ulrich-Bott B., Roggendorf W., Paton B.C., Harzer K. (1993) Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. *Hum Genet* **92**: 143-152
- Braun, P.E. und Snell, E. E. (1968) Biosynthesis of sphingolipid bases. II. Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*. *J. Biol. Chem.* **243**: 3775-3783
- 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**(5126):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, M.S. und Goldstein, J.L. (1985) The LDL receptor and HMG-CoA reductase--two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr Top Cell Regul.* **26**: 3-15
- 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
- Brunner, J., Senn, H. und Richards, F.M. (1980) 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. *J. Biol. Chem.* **255**: 3313-3318
- Burkhardt, J., Hüttler, S., Klein, A., Möbius, W., Habermann, A., Griffiths, G. und Sandhoff, K. (1997) Accumulation of sphingolipids in SAP-precursors (prosaposin) deficient fibroblasts occurs as intralysosomal membrane structures and can be completely reversed by treatment with human SAP-precursor. *Eur. J. Cell. Biol.*

- Callahan, J.W. (1999) Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal  $\beta$ -galactosidase and the non-lysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**(2-3): 85-103
- Callies, R., Schwarzmann, G., Radsak, K., Siegert, R. und Wiegandt, H. (1977) Characterization of the cellular binding of exogenous gangliosides. *Eur. J. Biochem.* **80**(2): 425-432
- Carrer D.C., Hartel S., Mónaco H.L. und Maggio B. (2003) Ceramide modulates the lipid membrane organization at molecular and supramolecular levels. *Chem. Phys. Lipids.* **122** (1-2): 147-52.
- Christomanou H., Aignesberger A. und Linke R.P. (1986) Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **367**(9): 879-90
- Conzelmann, E., Lee-Vaupel, M. und Sandhoff, K. (1988) The physiological roles of activator proteins for lysosomal glycolipid degradation. In: *Lipid Storage disorders: Biological and Medical Aspects.* Salvayre, R., Douste-Blazy, L., Gatt, S. (eds.), 323-332, NATO ASI Series , Plenum Press New York
- Dainton, D.F. (1971) Phagocytotic mechanisms in health and disease. *Intercontinental Book Corporation 1<sup>st</sup> Ed.*
- Dewey, M.M. und Barr, L. (1970) *Curr. Top. Membr. Transp.* **1**: 6
- Devaux, P.F. und Zachowski, A. (1994) Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem. Phys. Lipids* **73**: 107-120
- Döring T., Proia R.L. und Sandhoff K. (1998) Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in  $\beta$ -glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* **447**: 167-170
- Duncan M.J., Shin J.S. und Abraham S.N. (2002) Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol.* **4** (12): 783-91.
- EGGE, H. und Peter-Katalinic, J. (1987) Fast atom bombardment mass spectrometry for structural elucidation of glycoconjugates. *Mass Spectrom. Rev.* **6**: 331-393
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. und Hopkins, C. R. (1990) Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* **61**: 623-624
- 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 derivate 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
- Fürst, W. und Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. Review: *Biochim. Biophys. Acta* **1126**: 1-16
- Futerman, A. H., Stieger, B., Hubbart, 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

- Galpin I. J., Hardy, P. M., Kenner, G. W., McDermott, J. R., Ramage, R. Seely, J. H. und Tyson, R. G. (1979) The use of phenyl esters in peptide synthesis. *Tetrahedron* **35**: 2577-2582
- Garver, W.S. und Heidenreich, R.A. (2002) The Niemann-Pick C proteins and trafficking of cholesterol through the late endosomal/lysosomal system. *Curr. Mol. Med.* **2**(5): 485-505
- Gatt. S. (1966) Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *J. Biol. Chem.* **241**(16): 3724-3730
- Gatt, S. (1970) Enzymatic aspects of sphingolipid degradation. *Chem. Phys. Lipids* **5**: 235-249
- Gkantiragas, I., Brugger, B., Stuvén, 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
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russel, D. W. und Schneider, W. J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**: 1-39
- Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. und Gruenberg, J. (1991) Rab 5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**: 915-925
- Griffiths G., McDowall A., Back R. and Dubochet J. (1984) On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J. Ultrastruct. Res.* **89**(1) : 65-78
- Griffith, G., Hoflak, B., Simonis, K., Mellmann, I. und Kornfeld, S. (1988) The mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**: 329
- Gruenberg, J. und Howell, K.E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 453-481
- Gruenberg, J. und Maxfield, F.R. (1995) Membrane transport in the endocytotic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 552-563
- Guidotti, G. (1972) Membrane Proteins. *Annu Rev Biochem*, **41**: 731-752
- Hamanaka S., Hara M., Nishio H., Otsuka F., Suzuki A. und Uchida Y. (2002) Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J. Invest. Dermatol.* **119**: 416-423
- Harzer, K., Paton, B. C., Polos, A., Kustermann-Kuhn, B., Roggendorf, W. Gisar, T. und Popp, M. (1989) Sphingolipid activator protein deficiency in a 16 week old atypical Gaucher disease patient and his fetal sibling: biochemical signs of combined sphingolipidoses. *Eur. J. of Pediatr.* **149**: 31-39
- Harzer, K., Hiraiwa, M. und Paton, B.C. (2001) Saposins (sap) A and C activate the degradation of galactosylsphingosine *FEBS Lett.* **508**: 107-110
- Hörschemeyer, J. (1997) Synthese von zwei photoaktivierbaren Glucosyl-thio-ceramid-Derivaten und Untersuchungen ihrer Lipidnachbarschaft in Modellmembranen. *Diplomarbeit*, Universität Bonn
- Hörschemeyer, J. (2001) Untersuchung der Lipidnachbarschaft von Sphingolipiden in Modellmembranen und Membranen kultivierter Zellen. *Dissertation* Universität Bonn
- Ikonen, E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 470-477
- Jatzkewitz, H. und Sandhoff, K. (1963) On a biochemically special form of infantile amaturotic idiocy. *Biochim. Biophys. Acta.* **70**: 354-356
- Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N. J., van Meer, G. und Wieland, F. (1992) Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfraction. *J. Cell. Biol.* **117**: 259-267

- 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
- Joseph, S.B. und Tontonoz, P. (2003) LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**(2): 192-197
- Kawasaki, K., Kuge, O., Yamakawa, Y. und Nishijima, M. (2001) Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* **354**: 9-15
- Klenk, H.D. und Choppin, P.W. (1970) Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SV5) grown in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **66**(1): 57-64
- Kobayashi T., Strang E., Fang K.S., de Moerloose P., Parton R.G. und Gruenberg J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**: 193-197
- Kobayashi T., Startchev K., Whitney A.J. und Gruenberg J. (2001) Localization of lysobisphosphatidic acid-rich membrane domains in late endosomes. *Biol. Chem.* **382**: 483-485
- Kok, J. W., Babia, T. und Hoekstra, D. (1991) Sorting of sphingolipids in the endocytic pathway of HAT 29 cells. *J. Cell. Biol.* **114**: 231-239
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (1998) Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses. *Brain Pathol.* **8**(1): 79-100
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (1999), Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen *Angew. Chem.* **111**(11): 1632-1670
- Kolter, T., Proia, R.L. und Sandhoff K. (2002) Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**(29): 25859-25862.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **358**: 847-861
- Koolman, J. und Röhm, K.H. (2003) Taschenatlas der Biochemie. *Thieme* **3<sup>rd</sup> Ed.**: 215ff.
- Kornberg, R.D. und McConnell, H.M. (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2564-2568
- Koval, M. und Pagano, R. E. (1989) Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **108**: 2169-2181
- Koval, M. und Pagano, R. E. (1990) Sorting of an internalized plasma membrane lipid between recycling and degradative pathways in normal and Niemann-Pick, type A fibroblasts. *J. Cell Biol.* **111**: 429-442
- Lange, Y. (1991) Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res.* **32**: 329-339
- 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
- Lewis, V., Green, S. A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A. und Mellmann, I. (1985) Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* **100**: 1839-1847
- Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Moczall, H., Bernardo, K., Schuchman, E. und Sandhoff, K. (2001) Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J Biol Chem.* **276**: 5760-5768

- Linke, T., Wilkening, G., Lansmann, S., Moczall, H., Bartelsen, O., Weisgerber, J. und Sandhoff, K. (2001) Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol. Chem.* **382**: 283-290
- Lipsky, N. G. und Pagano, R. E. (1985) Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: Endogenously synthesized sphingomyelin and glucosylcerebroside analogues pass through the Golgi apparatus „en route“ to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **100**: 27-34
- Liu Y., Suzuki K., Reed J.D., Grinberg A., Westphal H., Hoffmann A., Doering T., Sandhoff K. und Proia R.L. (1998) Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure (SIMP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2503-2508
- Liou W., Geuze H. J. and Slot J. W. (1996) Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* **106(1)**: 41-58
- London, E. (2002) Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol.* **12(4)**: 480-486.
- Lykidis A. und Jackowski S. (2001) Regulation of mammalian cell membrane biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**: 361-93
- 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
- McKanna, J.A., Haigler, H.T. und Cohen, S. (1979) Hormone receptor topology and dynamics: morphological analysis using ferritin-labeled epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76(11)**: 5689-5693
- 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
- Meindl, P. und Tuppy, H. (1966) Darstellung und enzymatische Spaltbarkeit von  $\alpha$ -Ketosiden der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure *Mh. Chem.* **97**: 1628-1647
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**: 575-625
- 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
- Möbius W., van Donselaar E., Ohno-Iwashita Y., Shimada Y., Heijnen H.F., Slot J.W. und Geuze H.J. (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* **4**: 222-231
- Morimoto, S., Martin, B.M., Yamamoto, Y., Kretz, K.A. und O'Brien, J.S. (1989) Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3389-3393
- Mozzi R., Buratta S. und Goracci G. (2003) Metabolism and functions of phosphatidylserine in mammalian brain. *Neurochem. Res.* **2**: 195-214
- Munro, S. (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**: 377-388
- Norvick, P. und Zerial, M. (1997) The diversity of rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 496-504
- Okuyama H., Yamada K., Miyagawa T., Suzuki M., Prasad R. und Lands W.E. (1983) Enzymatic basis for the formation of pulmonary surfactant lipids by acyltransferase systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **221(1)**: 99-107



- 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**: 155-156
- Parton, R. G., Joggerst, B. und Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol.* **127**: 1199-1215
- 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<sup>th</sup> Ed.** McGraw Hill, New York: 3611-3633
- Peters, J.P., Hsu, V.W., Ooi, C.E. Finazzi, D. Teal, S.B., Oorschot, V. Donaldson, J.G. und Klausner, R.D. (1994) Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J. Cell Biol.* **128**: 1003-1017
- Pohlentz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D. und Sandhoff, K. (1988) Both GA2, GM2, and GD2 synthases and GM1b, GD1a, and GT1b synthases are single enzymes in Golgi vesicles from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**(19): 7044-7448
- Pütz, U. (1996) Synthese markierter Galaktosylthioglucoylceramide und ihre postendozytotische Glykosylierung in kultivierten Zellen. *Dissertation* Universität Bonn
- Renfrew, C. A. und Hubbard, A. I. (1991) Degradation of epidermal growth factor receptor in rat liver: membrane topology through the lysosomal pathway. *J. Biol. Chem.* **266**: 21265-21273
- Repa, J.J. und Mangelsdorf, D.J. (2002) The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat. Med.* **8**(11): 1243-1248.
- Rilling, H.C. und Chayet, L.T. (1985) Sterols and Bile Acids. *Elsevier* **1<sup>st</sup> Ed.**: 33
- Robinson, M.S., Watts, C. und Zerial, M. (1996) Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* **84**: 13-21
- Rothman, J.E., Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272** (5259): 227-234
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A. und Anderson, R.G. (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* **111**: 2931-2938
- Rother, J., van Echten, G. Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1992) Biosynthesis of sphingolipodes: dihydroceramide and not sphingosine is desaturated by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 14-20
- Rosenwald, A.G. und Pagano. R.E. (1993) Intracellular transport of ceramide and its metabolites at the Golgi complex: insights from short-chain analogs. *Adv. Lipid Res.* **26**: 101-118
- Sandhoff, K. (1977) Biochemie der Sphingolipidspeicherkrankheiten. *Angew. Chem.* **89**: 283-295
- Sandhoff, K: und van Echten, G. (1993) Ganglioside metabolism - topology and regulation *Adv. Lipid Res.* **26**: 119-142
- Sandhoff, K und Kolter, T. (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil. Trans. Soc. R. Lond.* **358**: 847-861
- Schlame, M. und Hostetler, K.Y. (1997) Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **260**: 380-386

- Schnabel, D., Schröder, M., Fürst, W., Klein, A., Hurwitz, R., Zenk, T., Weber, J., Harzer, K., Paton, B. C., Poulos, A., Suzuki, K. und Sandhoff, K. (1992) Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by mutation in the initiation codon of their common gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 3312-3315
- 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<sup>th</sup> Ed.** 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
- 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., 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*. Freysz, I., Deyfus, H., Massarelle, R. und Gatt, S. (eds.) 553-562, Plenum Press New York
- Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1987) Synthesis and use in preparing labeled gangliosides. *Methods in Enzymology* **138**: 319-341
- Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1990) Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry* **29**: 10865-10871
- 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**(36): 21271-21276
- Schwarzmann, G., von Coburg, A. und Möbius, W. (2000) Using biotinylated gangliosides to study their distribution and traffic in cells by immunoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* **312**:534-62
- Schwarzmann, G. (2001) Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**: 163-171
- 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
- Singer, S.J. und Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A., Cohn, Z.A. (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* **1**: 1-27
- Smith, E. R. und Merrill, A. H. jr. (1995) Differential roles of de novo biosynthesis and turnover in the „burst“ of free sphingosine and sphinganine and their 1-phosphates and N-acetyl-derivates that occurs upon changing the medium of cells in culture. *J. Biol. Chem.* **270**: 18749-18758
- Svennerholm, L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**: 613-623
- Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, **200** (4345): 1012-8
- Thiele, O.W. (1968) Biochemistry of phosphatides and glycolipids. *Hippokrates.* **39**(9): 317-23

- Tontonoz, P. und Mangelsdorf, D.J. (2003) Liver x receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.* **17**(6): 985-993
- Trinchera M., Fiorilli A. und Ghidoni R. (1991) Localization in the Golgi apparatus of rat liver UDP-Gal:glucosylceramide beta 1-4galactosyltransferase. *Biochemistry* **30**(10): 2719-2724
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., Hopkins, C.R. (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 129-161
- van der Sluijs, P., Hull, M. Webster, P. Male, P. Goud, B. und Mellman, I. (1992) The small GTP-binding protein rab 4 controls an early sorting event on the endocytotic pathway. *Cell* **70**: 729-740
- van der Spoel A., Bonten E. und d'Azzo A. (2000) Processing of lysosomal  $\beta$ -Galactosidase. *J. Biol. Chem.* **275**(14): 10035-10040
- van Deurs, B., Petersen, O. W., Olsnes, S. und Sandvig, K. (1989) The ways of endocytosis. *International Review of Cytology* **117**: 207-214
- van Echten, G., Iber, H., Stotz, H. Takatusuki, A. und Sandhoff, K. (1990) Uncoupling of ganglioside biosynthesis by brefeldin A. *Eur. J. Cell. Biol.* **52**: 135-139
- 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*, Plenum Press: 1-23
- Voet, D., Voet, J.G. (1990) *Biochemistry*. Wiley **1<sup>st</sup> Ed.**: 265ff.
- von Coburg, A. (1998) Synthese biotinmarkierter Derivate des Gangliosids GM1. Untersuchungen zu ihrer Aufnahme und ihrem Stoffwechsel in kultivierten Zellen. *Diplomarbeit* Universität Bonn
- 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
- Werth N., Schuette C., Wilkening G., Lemm T., Sandhoff K. (2001) Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by  $\beta$ -hexosaminidase A: Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J. Biol. Chem.* **276**: 12685-12690
- Wessling-Resnick, M. und Braell, W. A. (1990) The sorting and segregation mechanism of the endocytic pathway is functional in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **265**: 690-699
- 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. (1968) The structure and the function of gangliosides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **7**(2): 87-96
- Wieland, F., Gleason, M. L., Serafini, T. A. und Rothman, J. E. (1987) The bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**: 289-300
- Wilchek, M. und Bayer, E. A. (1984) The Avidin-Biotin Complex in Immunology. *Immunology Today* **3**: 34-43
- Wilkening, G., Linke, T., Uhlhorn-Dirks, G. und Sandhoff, K. (2000) Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. *J. Biol. Chem.* **275**: 35814-35819

- Williams, M. und McCluer, R. (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* **35**: 266-269
- Xu, X. und London, E. (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* **39**: 844-849
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G. Heissler, D., Vilcheze, C. und London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols an sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *J. Biol. Chem.* **276** (36): 33540-33546
- Yamada, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**: 445-458
- Yusuf, H. K. M., Pohlentz, G. und Sandhoff, K. (1983a) Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in rat liver Golgi apparatus by blocking sugar nucleotide transport across the membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 7075-7079
- Yusuf, H. K. M., Pohlentz, G., Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1983b) Ganglioside biosynthesis in Golgi apparatus of rat liver. Stimulation by phosphatidylglycerol and inhibition by tunicamycin. *Eur. J. Biochem.* **134**: 47-54
- Zha, X., Pierini, L. M., Leopold, P. L., Skiba, P. J., Tabas, I. und Maxfield, F. R. (1998) Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J. Cell Biol.*, **140**: 39-47