

Zielgerichtete Mutagenese der lysosomalen Lipase

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Oliver Zschenker
aus Oldenburg (Oldb)

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 1998 bis Dezember 2000 unter der Leitung von Privatdozent Dr. med. D. Ameis in der Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Marquardt
2. Gutachter: Herr PD Dr. D. Ameis

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY	6
ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	8
1.1. Der Lipoproteinmetabolismus	9
1.2. Funktion der lysosomalen Lipase	12
1.3. Der Cholesterolester-Zyklus	12
1.4. Cholesterolester-Zyklus und Arteriosklerose.....	14
1.5. Klinische relevante Defizienzen der lysosomalen Lipase	15
1.5.1. Die Wolman'sche Erkrankung.....	15
1.5.2. Die Cholesterolester-Speicherkrankheit	16
1.6. Die molekulare Struktur der lysosomalen Lipase.....	17
1.6.1. Genfamilie der Lipasen.....	17
1.6.2. Domänen der lysosomalen Lipase	22
1.6.3. Struktur motive	24
1.6.3.1. Phosphorylierungsstellen.....	24
1.6.3.2. Cysteinreste/Disulfidbrücken	26
1.6.3.3. Glykosylierung	26
1.6.3.3.1. Biosynthese der N-Glykane	27
1.6.3.3.2. Biosynthese der O-Glykane	28
1.6.3.3.3. Glykosylierung der lysosomalen Lipase	29
2. MATERIALIEN UND METHODEN.....	30
2.1. Materialien.....	30
2.1.1. Chemikalien	30
2.1.2. Plasmide/DNA	30
2.1.3. Proteine/Enzyme	31
2.1.4. Antikörper	31
2.1.5. Bakterienstämme und Zellen	31
2.1.6. Pufferlösungen und Medien/Agar.....	32
2.1.7. Datenbanken und Internet.....	32
2.1.8. Geräte.....	33
2.2. Methoden	33
2.2.1. Zielgerichtete Mutagenese	33

2.2.2. DNA Sequenzierung	36
2.2.3. Klonierung	37
2.2.4. Expression der lysosomalen Lipase mit dem Baculovirussystem	38
2.2.4.1. Kultur der <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen (Sf9-Zellen).....	38
2.2.4.2. Kotransfektion der rekombinanten Plasmid-DNA mit Baculovirus-DNA.....	39
2.2.4.3. Isolierung rekombinanter Viren (Plaquereinigung)	39
2.2.4.4. Identifikation und Amplifikation der rekombinanten Viren	40
2.2.4.5. Expressionsexperimente	40
2.2.4.6. Reinigung der lysosomalen Lipase aus Zellkulturüberstand	41
2.2.4.6.1. Nickel-Affinitätschromatographie	41
2.2.4.6.2. Proteinquantifizierung	41
2.2.4.6.3. Inhibition der Glykosylierung mit N-Methyldeoxynojirimycin und 1-Deoxymannojirimycin.....	42
2.2.4.6.4. Untersuchung der O-Glykosylierung.....	42
2.2.4.6.5. Deglykosylierung mit O-Glykosidase, Neuraminidase und N-Glykosidase F	42
2.2.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.2.4.8. Silberfärbung.....	43
2.2.4.9. Immundetektion, Western Blot.....	43
2.2.5. Enzymatische Aktivität und Kinetik der lysosomalen Lipase	44
2.2.5.1. Trioleinhydrolyse	44
2.2.5.2. Cholesteryloleat-Hydrolyse	45
2.2.5.3. Bestimmung der Kinetik der lysosomalen Lipase	46
2.2.5.3.1. Variation der Substratkonzentration	46
2.2.5.3.2. Variation der Enzymmenge	47
2.2.6. Versuch zur Aufnahme rekombinanter lysosomaler Lipase in LAL-defiziente Fibroblasten von Wolman-Patienten	47
2.2.6.1. Zellkultur.....	47
2.2.6.2. Zugabe lysosomaler Lipase zu LAL-defizienten K362-Fibroblastenzellen	47
3. ERGEBNISSE	48
3.1. Zielgerichtete Mutagenese	50
3.1.1. N-Glykosylierungsmutanten	50
3.1.2. O-Glykosylierungsstelle und Übergang Propeptid/matures Protein.....	50
3.2. Klonierung der $\Delta 49$-Mutante	53
3.3. Expression der lysosomalen Lipase in Insektenzellen	54
3.4. Reinigung der lysosomalen Lipase über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie	56
3.5. Untersuchung der N-Glykosylierung der lysosomalen Lipase	57
3.5.1. Einfachmutanten der N-Glykosylierungsstellen	57
3.5.2. Doppelmutanten der N-Glykosylierungsstellen.....	63
3.5.3. Kinetik der N-Glykosylierungsmutanten	67

3.5.4. Inhibition der Glykosylierung mit N-Methyldeoxynojirimycin und 1-Deoxymannojirimycin	68
3.6. Enzymatische Deglykosylierung der lysosomalen Lipase	69
3.7. Untersuchung der O-Glykosylierung	71
3.8. Mutationen an der vermuteten Prozessierungsstelle der lysosomalen Lipase ...	72
3.9. Zugabe rekombinanter lysosomaler Lipase zu Fibroblastenkulturen von Wolman-Patienten.....	74
4. DISKUSSION	75
4.1. Aufbau und Struktur der im Baculovirussystem exprimierten lysosomalen Lipase	75
4.2. Glykosylierung der lysosomalen Lipase.....	77
4.2.1. Chemische Untersuchungen	78
4.2.2. Zielgerichtete Mutagenese der Glykosylierungsstellen der lysosomalen Lipase	81
4.3. N-terminale Prozessierung	88
4.3.1. Zielgerichtete Mutagenese der Prozessierungsstelle K49/G50 und Untersuchung der Mutante $\Delta 49$	88
4.4. Mutationen bei Cholesterolester-Speicherkrankheit (CESD) und Wolman'scher Erkrankung	91
5. LITERATURVERZEICHNIS	94
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
7. SICHERHEITSDATEN DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	111
DANKSAGUNG	115
LEBENS LAUF	116

Summary

Lysosomal lipase (LAL; E.C. 3.1.1.13) is a key enzyme in intracellular lipid metabolism. It hydrolyzes exogenous triglycerides and cholesterol esters taken up by various cell types. The enzyme and its mutants were expressed in insect (*Sf9*) cells using the baculovirus system. LAL has six potential N-glycosylation sites and one potential O-glycosylation site. Western Blot analysis after restriction of LAL with N-Glycosidase F, Neuraminidase and O-Glycosidase showed that LAL is highly N-glycosylated, but data to the O-glycosylation were ambiguous. However, Peanut agglutinin lectin does not recognize hLAL, suggesting that the protein is not O-glycosylated. These data were in agreement with the results of the O-glycosylation mutant (T255V) of LAL, which showed no difference in activity in comparison to wildtype enzyme.

Elimination of each of the six N-glycosylation sites by site-directed mutagenesis resulted in two single mutant enzymes (N134Q and N246Q) without activity. These mutants were neither detectable in Western Blot analysis nor in silver-stained SDS-PAGE. N9Q was remarkable in that it was detectable but showed significantly reduced enzyme activity. Six double mutants in all combinations except for the two inactive single mutants were produced. Double mutants in combination with the N9-glycosylation site showed a reduced activity compared to the other mutants or wildtype lipase. These data indicate that three of the six N-glycosylation sites are used in native lipase. N9 is glycosylated, but only N134 and N246 appear essential for LAL activity.

LAL contains a putative propeptide consisting of 49 aminoacids. A deletion mutant (Δ 49) and two mutants at the suspected processing site of the propeptide to mature enzyme (K49R and G50A) were produced. K49R showed wildtype enzyme activity and was detectable in Western Blot analysis. G50A and Δ 49 were not detectable and only showed residual activities. These results support the assumption that a propeptide is essential for an active and stable enzyme. G50 as a conserved amino acid residue in acid lipases may be a recognition signal for proteolytic enzymes.

Zusammenfassung

Die lysosomale Lipase (LAL; E.C. 3.1.1.13) ist ein Schlüsselenzym im intrazellulären Lipidmetabolismus. Sie hydrolysiert exogene, mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle aufgenommene Triglyzeride und Cholesterolester. Das Enzym und Mutanten wurden in Insektenzellen (*Sf9*) mittels eines Baculovirus exprimiert.

Die LAL hat sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle. Eine Western Blot-Analyse nach Verdau des Wildtypenzym mit N-Glykosidase F, Neuraminidase und O-Glykosidase zeigte, daß die LAL hoch N-glykosyliert ist. Die LAL ist nicht O-glykosyliert, wie ein Test mit „Peanut agglutinin lectin“ belegte. Diese Daten werden durch eine Aktivitätsmessung der O-Glykosylierungsmutante (T255V) der LAL unterstützt, die keine signifikante Veränderung in der Aktivität gegen Wildtypenzym aufwies.

Die Eliminierung einzelner N-Glykosylierungsstellen mittels zielgerichteter Mutagenese ergab zwei Mutanten der LAL (N134Q und N246Q), die keine enzymatische Aktivität aufwiesen. Diese Mutanten konnten weder im silbergefärbten SDS-PAGE noch im Western Blot nachgewiesen werden. N9Q nahm eine Sonderstellung ein, weil diese Mutante eine signifikant verringerte Aktivität aufwies. Deshalb wurden Doppelmutanten dieser N-Glykosylierungsstelle in den möglichen Kombinationen außer mit N134 und N246 hergestellt. Die Mutanten in Kombination mit N9 zeigten deutlich geringere Werte für die Aktivität als Wildtypenzym oder die restlichen Kombinationen. Die Daten legen den Schluß nahe, daß drei der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen tatsächlich in der nativen Lipase ausgebildet werden. N9 ist glykosyliert, aber nur N134 und N246 sind für die Aktivität des Enzyms essentiell.

Die LAL besitzt ein 49 Aminosäuren umfassendes Propeptid. Es wurden eine Deletionsmutante $\Delta 49$ und zusätzlich zwei Mutanten am Übergang von Propeptid zu maturer LAL (K49R und G50A) hergestellt. K49R zeigte Wildtypenzymaktivität und konnte in der Western Blot-Analyse detektiert werden. G50A und $\Delta 49$ wurden nicht nachgewiesen und zeigten nur Restaktivitäten. Diese Ergebnisse deuten auf die Notwendigkeit der Existenz des Propeptids für ein stabiles und aktives Enzym hin. G50 als konservierte Aminosäure bei den sauren Lipasen könnte ein Erkennungssignal sein, das den prozessierenden Enzymen als Stop-Signal dient.

1. Einleitung

In den hochindustrialisierten Staaten sind Folgekrankheiten der Arteriosklerose die häufigsten Todesursachen. Mit ihren typischen Gefäßwandveränderungen wie Verdickung, Verhärtung und damit einhergehendem Elastizitätsverlust stellt die Arteriosklerose die Hauptursache für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlüssen dar. Als Risikofaktoren werden neben Bewegungsmangel, Bluthochdruck und Nikotinmißbrauch vor allem Fettstoffwechselstörungen verantwortlich gemacht. Fettstoffwechselstörungen können durch verschiedene endogene und exogene Faktoren verursacht werden. Dazu gehören auf molekularer Ebene Apolipoproteine, Lipoproteinrezeptoren, Transportproteine und Enzyme (Assmann, 1982; Breslow, 1989; Cooper, 1990; Beisiegel *et al.*, 1995; Lusic, 2000).

Die vorliegende Arbeit untersucht ein Enzym des Lipidmetabolismus, dessen Existenz schon lange bekannt ist und das eine Schlüsselrolle einnimmt, da es ein Bindeglied zwischen intra- und extrazellulärem Fettstoffwechsel darstellt: die lysosomale Lipase. Dieses Enzym ist in nahezu allen Körperzellen lokalisiert und hydrolysiert exo- und endogen zugeführte Triglyzeride und Cholesterolester. Entstehendes freies Sterol und freie Fettsäuren werden aus den Lysosomen zu anderen intrazellulären Orten (z.B. Mitochondrien und Endoplasmatisches Reticulum) transportiert. Freies Cholesterol wird zum Teil der Plasmamembran zugeführt, jedoch hauptsächlich als Substrat für die Synthese von Membranbestandteilen und Steroiden genutzt (Fielding u. Fielding, 1985) und greift über verschiedene Mechanismen selbst in die Regulation des Fettstoffwechsels ein (Goldstein *et al.*, 1975; Ginsberg, 1990). Die klinische Relevanz der lysosomalen Lipase wird durch zwei Krankheiten, die durch Defizienzen des Enzyms hervorgerufen werden, deutlich. Es handelt sich um die Wolman'sche Erkrankung (Abramov *et al.*, 1956; Patrick u. Lake, 1969) und die Cholesterolester-Speicherkrankheit (CESD) (Fredrickson, 1963; Burke u. Schubert, 1972). So wurde der lysosomalen Lipase vor dem Hintergrund klinischer Studien und pathophysiologischer Überlegungen eine Sonderstellung bei der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen eingeräumt (Coates *et al.*, 1986; Yatsu u. Fisher, 1989).

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird der Lipoproteinmetabolismus beschrieben, und es wird auf die physiologische Rolle der lysosomalen Lipase und den Cholesterolester-Zyklus eingegangen. Danach werden die Wolman'sche Erkrankung und die Cholesterolester-Speicherkrankheit beschrieben. Die lysosomale Lipase wird anhand

ihrer Primärsequenz in den Zusammenhang der Genfamilien der sauren und neutralen Lipasen gestellt. Ein Vergleich mit der humanen gastrischen Lipase erlaubt die Bildung eines dreidimensionalen Modells für die lysosomale Lipase. Die Primärsequenz der lysosomalen Lipase enthält Struktur motive wie Cysteinreste und Glykosylierungsstellen, die im letzten Abschnitt beschrieben werden.

1.1. Der Lipoproteinmetabolismus

Der Transport wasserunlöslicher Lipide wie Triglyzeride, Cholesterol und Cholesterolester erfolgt im Plasma in Form von Lipoproteinkomplexen, die aus einer hydrophilen Hülle und einem lipophilen Kern bestehen. Phospholipide befinden sich mit ihrem Lipidanteil im Kern und mit ihrem Phosphatanteil an der Oberfläche der Lipoproteine. Die Hülle wird von amphipathischen Apolipoproteinen gebildet. Die klassische Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrem Dichteverhalten in der Ultrazentrifugation. Es wurden fünf Klassen gebildet: Chylomikronen, Very low-density Lipoproteine (VLDL), Intermediate-density Lipoproteine (IDL), Low-density Lipoproteine (LDL) und High-density Lipoproteine (HDL) (Havel *et al.*, 1955). Die Apolipoproteine sind zum einen für die Stabilität der Partikel verantwortlich, zum anderen bestimmen sie die rezeptorvermittelte Aufnahme und deren Geschwindigkeit in Zielorgane (Beisiegel, 1992). Die Synthese der Apolipoproteine findet in der Darmmucosa, der Leber und im Plasma statt.

Der Stoffwechsel der Lipoproteine verläuft über einen exo- und einen endogenen Weg (Brown *et al.*, 1981; Schmitz u. Assmann, 1989) (**Abb.1**). Ausgangspunkt des exogenen Weges ist die Dünndarmmucosa. Mit der Nahrung aufgenommene Triglyzeride, Cholesterolester und andere Lipide werden im Darmlumen durch die pankreatische Lipase in Mono- und Diglyzeride, freie Fettsäuren und freies Cholesterol hydrolysiert und resorbiert. Im Rauhen Endoplasmatischen Reticulum (RER) der Darmmucosa werden die gespaltenen Stoffe durch die Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyl-Transferase (ACAT) reverestert. Diese werden für den Transport mit einer Hülle aus Phospho- und Apolipoproteinen (A-I, A-II, A-IV und B-48) versehen und so zu Chylomikronen assoziiert. Sie gelangen nach der Sekretion schließlich in den Blutkreislauf. Die Triglyzeride der Chylomikronen werden dabei von der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL) zu Monoglyzeriden und freien Fettsäuren hydrolysiert (Ameis *et al.*, 1992) und vom Gewebe

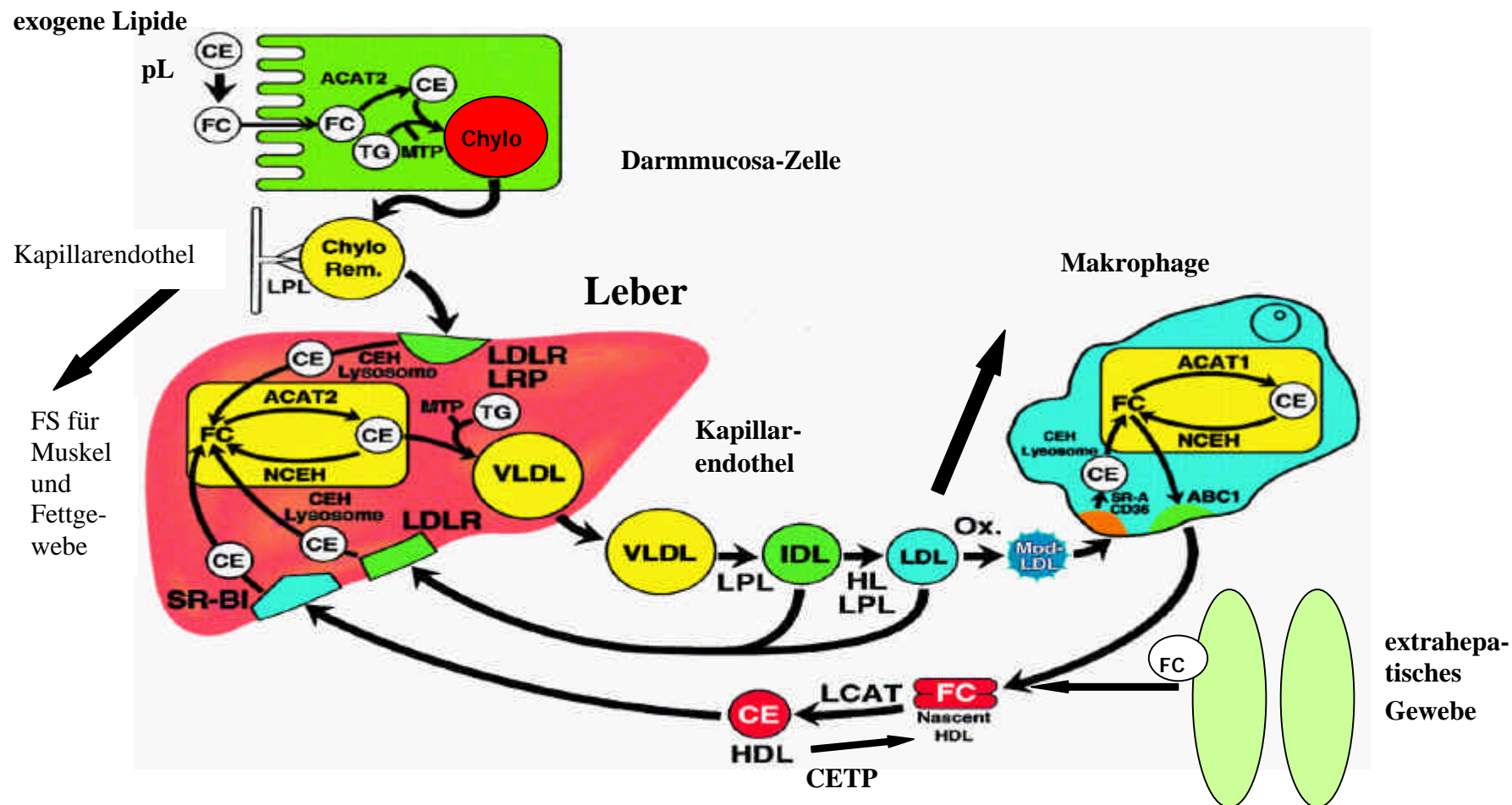


Abb. 1. Übersicht über den Lipidmetabolismus. Über den endogenen Weg werden Lipide an VLDL assoziiert; diese wandeln sich zu LDL um, über welche die Lipide endozytiert werden. Bei der Entstehung der Arteriosklerose spielen Scavenger-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche eine Rolle. Sie nehmen überproportional viele chemisch modifizierte LDL auf. Dies führt zur Überladung der Zellen, die sich dadurch zu sogenannten Schaumzellen umwandeln. Diese werden als Ursache für die Ausbildung arteriosklerotischer Plaques diskutiert. Über den exogenen Weg werden Lipide, an Chylomikronen assoziiert, von der Leber aufgenommen. **CE**: Cholesterolester, **FC**: freies Cholesterin, **ACAT**: Acyl-Coenzym A-Cholesterolester-Transferase, **TG**: Triglyceride, **pL**: pankreatische Lipase, **MTP**: mikrosomales Transferprotein, **Chylo**: Chylomikronen, **LPL**: Lipoproteinlipase, **FS**: Fettsäure, **NCEH**: neutrale Cholesterolesterhydrolase, **CEH**: Cholesterolesterhydrolase, **LDLR**: LDL-Rezeptor, **LRP**: LDL-Rezeptor-related Protein, **HDL**: High density Lipoprotein, **LDL**: Low density Lipoprotein, **IDL**: Intermediate density Lipoprotein, **VLDL**: Very low density Lipoprotein, **HL**: hepatische Lipase, **LCAT**: Lecithin-Cholesterolester-Transferase, **CD36** und **SRA**: Scavenger-Rezeptoren, **ABC1**: Transporter, **SR-B1**: spezifischer Leberrezeptor (mod. nach Brewer, 2000).

als Energiequelle aufgenommen. Die hierbei entstehenden Partikel werden als Chylomikron-Remnants bezeichnet.

Chylomikronen-Remnants weisen einen hohen Cholesterolgehalt auf und bestehen nach der Interaktion mit HDL-Partikeln aus den Apolipoproteinen Apo B-48 und E. Beide Apolipoproteine ermöglichen die Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leber mittels rezeptorvermittelter Endozytose (Beisiegel, 1995). Apo E spielt hierbei eine besondere Rolle, da es als Ligand für den LDL-Rezeptor (Brown u. Goldstein, 1986), den VLDL-Rezeptor (Takahashi *et al.*, 1995), das LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) (Beisiegel *et al.*, 1989) und den Scavenger-Rezeptor (Freeman, 1994) dient.

Der endogene Weg des Lipoproteinmetabolismus beginnt mit der hepatozellulären Aufnahme der Chylomikron-Remnants. Bei der hepatozellulären Entstehung der VLDL lagern sich Phospholipide, Triglyzeride, Cholesterolester und freies Cholesterol um ein Molekül Apo B-100. Nach der Sekretion ins Plasma werden zusätzlich Apo C und Apo E von den HDL aufgenommen. VLDL interagieren mit der endothelständigen LPL, wobei die Triglyzeride hydrolysiert werden. Anschließend erfolgt die Rückübertragung von Apo C und E an HDL. Ähnlich dem exogenen Weg wird der Rest der Oberfläche (Phospholipide und freies Cholesterol) der VLDL-Partikel auf HDL und nach der Veresterung durch die LCAT auf IDL-Partikel übertragen. Diese enthalten zusätzlich Apo B-100 und werden zu LDL-Partikeln umgewandelt (Grosser *et al.*, 1981). Die Umwandlung besteht in dem Verlust des Apo E und der Aufnahme von Chylomikron-Remnants. Diese werden durch die Transportfunktion des Cholesterolester-Transferproteins (CETP) von HDL auf VLDL-Remnants übertragen. Die LDL enthalten schließlich nur noch ein Apolipoprotein, das Apo B-100. Der größte Anteil der LDL wird von der Leber aufgenommen, und ein Teil wird von peripheren Geweben katabolisiert. LDL versorgt die peripheren Gewebe mit Cholesterol.

Bei einer Überladung peripherer Gewebe mit Cholesterol kann dieses durch den reversen Cholesteroltransport zur Leber zurück transportiert werden. Die Leber ist das wichtigste Organ, über das Cholesterol aus dem Organismus eliminiert werden kann. Im Plasma dienen HDL als Vehikel für das Cholesterol. Sie enthalten als Apolipoproteine A-I, A-II und C. Die HDL werden je nach ihrem Verhältnis von Protein zu Lipidanteil in die Fraktionen HDL₂ und HDL₃ eingeteilt. Nur die cholesterolarmen HDL₃ sind in der Lage, Cholesterol aus den Membranen der Zellen aufzunehmen. Hierbei entstehen HDL₂-Partikel. In diesen Partikeln wird freies Cholesterol von der HDL-assoziierten LCAT mit Fettsäuren verestert. Es kann nun einerseits zur Leber transportiert und ausgeschieden

werden. Andererseits kann es auch mit Hilfe des CETP auf andere Lipoproteine wie VLDL oder IDL übertragen und so weiter metabolisiert werden. Der Austausch des Cholesterols zwischen Gewebe und HDL wird durch HDL-Rezeptoren vermittelt.

1.2. Funktion der lysosomalen Lipase

Im Blut zirkulierende Lipoproteine, insbesondere LDL, werden über Lipoprotein-Rezeptoren in die Zelle endozytiert (Assmann u. Seedorf, 1995). Nach Bindung der LDL schnüren sich „Coated pits“ ab, aus denen nach Absinken des pH-Wertes und Verlust der Clathrinhülle Endosomen entstehen. Bevor das Endosom mit einem Lysosom fusioniert, dissoziieren LDL-Rezeptor und Lipoproteinpartikel. Letztere werden nach Fusion des Endosoms mit einem Lysosom durch lysosomale Enzyme abgebaut. In dieser Lokalisation spielt die lysosomale Lipase eine zentrale Rolle, indem sie die Hydrolyse von Triglyzeriden und Cholesterolestern katalysiert. Hierbei werden Fettsäuren, Monoglyzeride und Cholesterol freigesetzt und ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma werden die freien Fettsäuren im Rahmen der β -Oxidation zur Energiegewinnung verbraucht oder erneut verestert. Das freigesetzte Cholesterol geht in das zytoplasmatische Gleichgewicht an Cholesterol ein (**Abb. 2**). Dieses wird durch verschiedene Enzym-systeme streng reguliert. Die Funktion der lysosomalen Lipase wurde erstmals 1975 von Goldstein und Mitarbeitern an Hautfibroblasten untersucht (Goldstein *et al.*, 1975).

1.3. Der Cholesterolester-Zyklus

Die lysosomale Lipase hydrolysiert den Großteil der von den Zellen aus dem Plasma aufgenommenen Triglyzeride und Cholesterolester. Das freigesetzte Cholesterol wird in den zytoplasmatischen Cholesterolpool eingespeist und dient dort als Baustein für die Synthese von Membranstrukturen und Steroiden. Änderungen der intrazellulären Cholesterol-Konzentration führen zu drei Regulationsmechanismen, durch welche die zytoplasmatische Konzentration von freiem Cholesterol konstant gehalten wird:

1. Die Expression des Schrittmacherenzym β -Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase wird bei Cholesterolmangel stimuliert (Gil *et al.*, 1988).

1. Einleitung

2. Die Veresterung von zytosolischem Cholesterol durch die ACAT wird durch freies Cholesterol erhöht (Cheng *et al.*, 1995).
3. Die Expression von LDL-Rezeptoren und damit die Aufnahme von LDL-Partikeln durch rezeptorvermittelte Endozytose wird bei geringem Cholesterolbedarf supprimiert (Brown u. Goldstein, 1986).

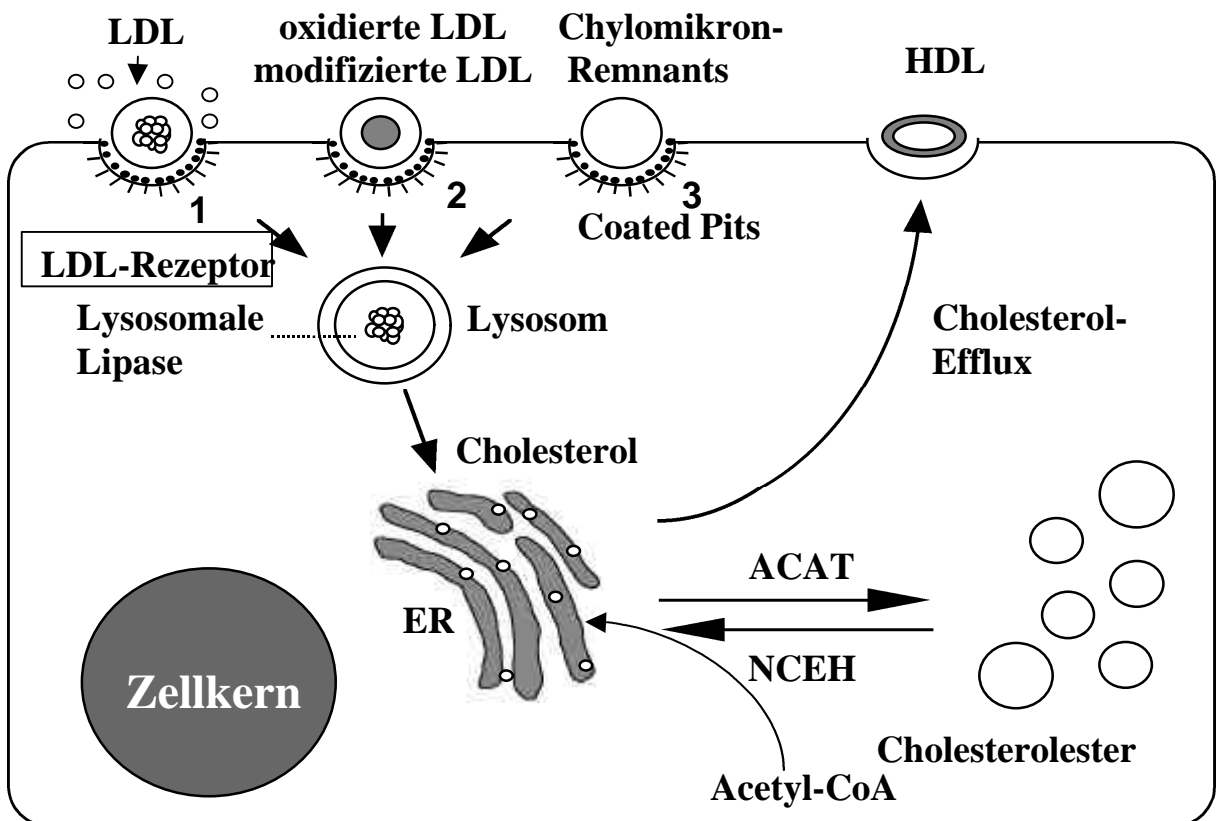


Abb. 2. Rolle der lysosomalen Lipase im intrazellulären Lipidmetabolismus. Die Lipoproteine werden über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. 1: LDL-Rezeptor, 2: Scavenger-Rezeptor, 3: LRP: Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein; ACAT: Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase; NCEH: Neutrale Cholesterolester-Hydrolase; LDL: Low-density Lipoprotein; HDL: High-density Lipoprotein; HMG-CoA-Reduktase: β -Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A Reduktase; ER: Endoplasmatisches Reticulum.

Gespeicherte Cholesterolester können von einer neutralen Cholesterolester-Hydrolase (NCEH) hydrolysiert werden (Ozasa *et al.*, 1989); hierbei freigesetztes Cholesterol fließt in den zytosomatischen Cholesterolpool ein. Überschüssiges Cholesterol wird aus der Zelle entfernt, indem es zunächst zur Zellmembran transferiert und von dort auf HDL-Partikel übertragen wird. In steroidogenen Geweben (Nebennieren) und dem Fettgewebe

wurde die NCEH als hormon-sensitive Lipase (HSL) identifiziert, während die NCEH anderer Gewebe nur anhand ihrer lipolytischen Aktivität nachgewiesen und bisher nicht weiter charakterisiert wurde. Die in arteriellen Schaumzellen gemessene niedrige Aktivität der NCEH wurde vor kurzem auf eine geringe Expression der HSL zurückgeführt (Harte *et al.*, 2000).

Da der zelluläre Influx von exogenen Cholesterolestern durch die Anzahl von LDL-Rezeptoren kontrolliert wird, könnte angenommen werden, daß die lysosomale Lipase selbst keiner Regulation unterliegt. In Tierexperimenten wurde jedoch gezeigt, daß die lysosomale Lipase in Leber, Darm, und Nebennieren, den Geweben hohen Cholesterolester-Angebots, deutlich stärker exprimiert wird als in Geweben wie Herz oder Niere (Du *et al.*, 1996). Die Mechanismen der Regulation sind noch weitgehend unbekannt.

1.4. Cholesterolester-Zyklus und Arteriosklerose

Neben den hochaffinen LDR-Rezeptoren ist ein weniger effizienter Weg der Verstoffwechslung von Lipiden beschrieben worden, der jedoch klinische Relevanz für die Entstehung der Arteriosklerose hat (Steinberg, 1991). Dieser verläuft über Scavenger-Rezeptoren (Rohrer, 1991), die in hoher Dichte auf der Oberfläche von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) lokalisiert sind. Dieser Rezeptor wird im Gegensatz zum LDL-Rezeptor nicht durch die Konzentration zytoplasmatischen Cholesterols reguliert. Während der Zirkulation von Lipoproteinen im Plasma bleibt ein Teil am Endothel der Gefäßwände haften, und die ungesättigten Fettsäuren der LDL sind dort der Oxidation, Acetylierung und anderen Modifikationen durch Plasmabestandteile ausgesetzt. Die modifizierten LDL werden nicht durch den LDL-Rezeptor internalisiert, sondern gelangen über den Scavenger-Rezeptor in die Zellen des Endothels. Bei einer hohen Konzentration von LDL im Plasma werden entsprechend viele LDL aufgenommen. Zunächst akkumulieren Cholesterolester und Triglyzeride in zytoplasmatischen Lipidvakuolen. Monozyten wandern aus der Blutbahn in die Gefäßwand ein und differenzieren zu Makrophagen, die ebenfalls den Scavenger-Rezeptor exprimieren. Bei fortschreitendem Influx von oxidierten LDL akkumuliert dieses auch in den Lysosomen der Makrophagen (Yancey u. Jerome, 1998). Es erfolgt eine reaktive Umwandlung der

Zellen zu Schaumzellen; diese werden als frühes Stadium arteriosklerotischer Plaques aufgefaßt.

Eine Überladung der Lysosomen mit Lipiden tritt auch bei einer Defizienz der lysosomalen Lipase auf. Die Ausbildung der Wolman'schen Erkrankung und der Cholesterolester-Speicherkrankheit ist durch Aktivitätsverlust der lysosomalen Lipase bedingt (Burke u. Schubert, 1972). Dabei zeigt die Cholesterolester-Speicherkrankheit trotz bei verschiedenen Patienten frühzeitig auftretender Arteriosklerose einen klinisch deutlich mildereren Verlauf im Vergleich zur Wolman'schen Erkrankung.

1.5. Klinische relevante Defizienzen der lysosomalen Lipase

1.5.1. Die Wolman'sche Erkrankung

1956 beschrieben Abramov und Mitarbeiter in Israel den Fall eines Kindes persischer Juden, das im dritten Lebensmonat an einer Nebennierenverkalkung verstarb. Es wurde eine massive Cholesterol- und Triglyzeridspeicherung in Leber, Nebennieren, Milz und Lymphknoten nachgewiesen (Abramov *et al.*, 1956). Erkrankte Kinder leiden unter starkem Erbrechen, Durchfällen und Hepatosplenomegalie und sterben meistens innerhalb des ersten Lebensjahres. Es wird retrospektiv vermutet, daß es sich bei zwei 1946 von Alexander beschriebenen Fällen eines Morbus Niemann-Pick ebenfalls um die Wolman'sche Erkrankung handelte (Alexander, 1946). Beide Erkrankungen manifestieren sich mit ähnlichen klinischen Symptomen; im Fall der Wolman'schen Erkrankung sind jedoch Nebennierenverkalkungen nachweisbar, die als pathognomisch gelten. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die fehlende Ablagerung von Phospholipiden bei der Wolman'schen Erkrankung (Dienst u. Hamperl, 1927). Bei der Wolman'schen Erkrankung wird Cholesterol vor allem in seiner veresterten Form gespeichert (Wolman, 1964). Zunächst wurde durch Patrick und Lake das Fehlen der katalytischen Aktivität einer sauren lysosomalen Lipase in Leber- und Milzzellen erkrankter Kinder nachgewiesen (Patrick u. Lake, 1969). Später wurde dieser Enzymdefekt auch in anderen Geweben nachgewiesen. In der Literatur sind mittlerweile mehr als 90 Fälle beschrieben und größtenteils molekularbiologisch untersucht worden. Dabei wurden sowohl Missense- und Nonsense- als auch Insertions- und Deletionsmutanten gefunden.

Folgende Mutationen sind Beispiele: L179P (Anderson *et al.*, 1994), A-Insertion in Codon 117, was zu trunkierter lysosomaler Lipase führt (Mayatepek *et al.*, 1999), G-5R (Zschenker *et al.*, 2001, eingereicht).

Von einer japanischen Arbeitsgruppe wurde ein Stamm von Donryu-Ratten beschrieben, in dem einige Tiere typische Symptome der Wolman'schen Erkrankung zeigten (Kuriyama *et al.*, 1990). Dieser Rattenstamm dient als Tiermodell der Wolman'schen Erkrankung. In der Leber dieser Tiere wurde eine massive Akkumulation von Cholesterolestern, freiem Cholesterol und Triglyzeriden nachgewiesen. In der Milz wurden ebenfalls Cholesterolester und freies Cholesterol, jedoch keine Triglyzeride angehäuft. Die Aktivität der lysosomalen Lipase konnte weder in der Leber noch in der Milz der Tiere detektiert werden. Heterozygote Tiere wiesen eine mittlere Aktivität der lysosomalen Lipase auf und zeigten keine Lipidakkumulation in Leber und Milz. Die Ursache der Defizienz der lysosomalen Lipase dieser Ratten wurde auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Es handelt sich um eine 4,5 kB-Deletion der genomischen DNA (Nakagawa *et al.*, 1995).

Vor kurzem wurde erneut über die erfolgreiche Behandlung eines Patienten berichtet, bei dem im vierten Lebensmonat eine Wolman-Erkrankung diagnostiziert wurde. Bei dem Patienten, der zwei Mutationen im Lipase-Gen aufwies (347G>A/stop codon und 724delT), wurde eine Knochenmarks-Transplantation durchgeführt. Mittlerweile ist der Patient vier Jahre alt und zeigt normale Werte für Cholesterol und Triglyzeride, eine normale Aktivität der lysosomalen Lipase in den Leukozyten und eine normale Größe von Leber und Milz (Krivit *et al.*, 2000).

1.5.2. Die Cholesterolester-Speicherkrankheit

1963 beschrieb Fredrickson erstmals den Fall eines Kindes mit einer Hypercholesterolämie und massiver Hepatomegalie; die Cholesterolester der Leber lagen 18% über der Norm. Aufgrund des ausgeprägten Leberbefundes bezeichnete Fredrickson das Erkrankungsbild als Störung der hepatischen Cholesterolesterspeicherung (Fredrickson, 1963). Nach Untersuchung weiterer Fälle wurde ein Zusammenhang mit der Defizienz einer sauren Cholesterolesterase nachgewiesen (Burke u. Schubert, 1972). Patienten mit Cholesterolester-Speicherkrankheit weisen eine Restaktivität von 10-12% der lysosomalen Lipase auf. Die Cholesterolester-Speicherkrankheit geht im Gegensatz zur Wolman'schen Erkrankung nicht mit einer Akkumulation von Triglyzeriden in den

Zellen einher. Bei Autopsie von adulten Patienten mit Cholesterolester-Speicherkrankheit wurde eine frühzeitige Arteriosklerose nachgewiesen. Kürzlich wurde neben einer Akkumulation von Cholesterolestern in der Leber auch eine Akkumulation in den Leydig-Zellen des Testis eines mit zweiundfünfzig Jahren an Cholesterolester-Speicherkrankheit nach beschleunigter Arteriosklerose und Leberkarzinom verstorbenen Patienten nachgewiesen (Ellender *et al.*, 2000). Ob diese Phänotypen direkt im Zusammenhang mit einer Defizienz der lysosomalen Lipase stehen oder ob es sich dabei um sekundäre Konsequenzen des veränderten Lipidstoffwechsels handelt, ist nicht klar.

Die Cholesterolester-Speicherkrankheit ist inzwischen bei etwa 70 Fällen auf molekularer Ebene untersucht worden. Wie bei den Wolman-Patienten fanden sich verschiedene Mutationen im Gen der lysosomalen Lipase. Zum Beispiel: $\Delta 248-272$ -Deletion (Ameis *et al.*, 1995), L273S (Pagani *et al.*, 1996), C233T (Redonnet-Vernhet *et al.*, 1998), G->A Mutation im letzten Nukleotid des Exon 8 (Du *et al.*, 1998). Die analysierten Mutationen lassen bisher keine Schlußfolgerung über die molekularen Grundlagen des Unterschieds zwischen Wolman'scher Erkrankung und Cholesterolester-Speicherkrankheit zu.

1.6. Die molekulare Struktur der lysosomalen Lipase

1.6.1. Genfamilie der Lipasen

Lipasen hydrolysieren wasserunlösliche Lipide. Voraussetzung dafür ist, daß sie sich an der Grenzfläche von Lipid/Wasser anheften und dort das Substrat umsetzen. Sowohl Pro- als auch Eukaryonten sind auf aktive Lipasen angewiesen. Interessanterweise weist die Topologie pro- und eukaryotischer Lipasen einige gemeinsame Motive auf (Smith *et al.*, 1992). Lipasen, von denen Kristallstrukturanalysen durchgeführt wurden, wie die humane pankreatische Lipase oder die humane gastrische Lipase, weisen eine α - β -Faltblattstruktur auf, wobei das Innere der Lipasen aus einem gemischten β -Faltblatt besteht. In Analogie zu den Serinproteasen besteht das aktive Zentrum aller Lipasen aus einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat oder Glutamat. Im Gegensatz zu der topologischen Ähnlichkeit der Lipasen weisen sie auf der Ebene der Primärsequenzen kaum Homologien auf. Eindeutige Homologien finden sich jedoch im

Bereich zweier Pentapeptidmotive (G-X-S93-X-G und G-X-S147-X-G). Das letztere Motiv wurde bisher in allen klonierten Lipasen und einigen Esterasen angetroffen und umfaßt das katalytisch aktive Serin.

Die Lipasen höherer Wirbeltiere werden in neutrale und saure Lipasen eingeteilt, die jeweils einer Genfamilie angehören (Kirchgessner *et al.*, 1989; Hide *et al.*, 1992). Zu den neutralen Lipasen gehören die LPL, die hepatische Lipase und die pankreatische Lipase. Die neutralen Lipasen sind intensiv hinsichtlich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften charakterisiert worden. Die dreidimensionale Struktur der pankreatischen Lipase wurde durch Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins aufgeklärt (Winkler *et al.*, 1990). Das katalytische Zentrum der pankreatischen Lipase liegt in einer Mulde im Inneren des Moleküls, dem „Oxyanion hole“. Es wird von einer Helix, die als „Lid“ bezeichnet wird, bedeckt. Mit Hilfe der Daten, die durch die Röntgenstrukturanalyse der pankreatischen Lipase gewonnen wurden, konnte ein Modell für die LPL entwickelt werden (Van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Hierdurch wurde eine Vorstellung von der Konformation des LPL-Dimers möglich. Die Bereiche der Proteoglycane der LPL, die für die Bindung an das Endothel verantwortlich sind, wurden eingrenzbar. Röntgenstrukturanalysen dieses Enzyms wurde ein Modell für die lysosomale Lipase entwickelt (Roussel *et al.*, 1999). Die eigene Arbeitsgruppe entwickelte in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Friedhoff (Justus-Liebig-Universität, Giessen) daraus rechnervermittelt ein 3D-Modell für die lysosomale Lipase (**Abb. 3**).

Über den Verwandtschaftsgrad der Primärsequenzen innerhalb der sauren Lipasen läßt sich ein Dendrogramm erstellen (**Abb. 4**). Hieraus wird ersichtlich, daß die lysosomale Lipase weniger Ähnlichkeit mit den übrigen sauren Lipasen hat als diese untereinander.

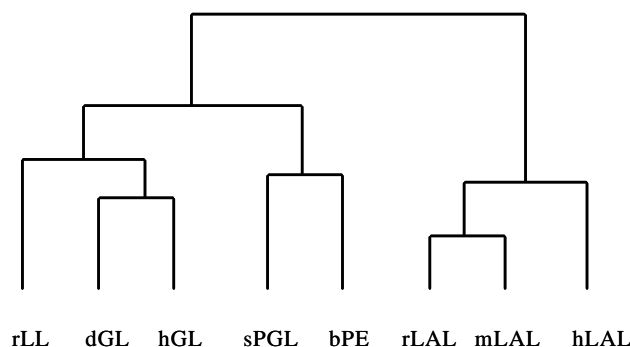


Abb. 4. Dendrogramm der Genfamilie der sauren Lipasen. Zur Herstellung des Dendrogramms wurde ein Profam tool verwendet (<http://www.mips.biochem.mpg.de/htbin/qfam.com/fs=0504.0>). rLL: linguale Lipase der Ratte; dGL: gastrische Lipase des Hundes; hGL: humane gastrische Lipase; sPGL: prägastrische Lipase des Schafes; bPE: bovine prägastrische Esterase; rLAL: lysosomale Lipase der Ratte; mLAL: lysosomale Lipase der Maus; hLAL: humane lysosomale Lipase

1. Einleitung

a.

1

MKMRFLGLVCLVLWPLHSEGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSEEYLVETEDGYILCLNRIPHGKRNHSD
 --MQLLGRVICFVVGILLSGGPTGTISAVDPEANMNVTEIIMHWGYP--EHSVQTDGTYILGVHRIPHGKRNQFD
 --MWLLLTMASLISVLGTTTHGLFGLKHPGSPEVTMNISQMITYWGYPNEEYEVVTEDEGYILEVNRIPYGKKNNSGN
 --MWLLL-ITSVISTFGGAHGLFGLKHPGNPEANMNISQMITYWGYPNQEYEVVTEDEGYILGVYRIPHGKNNSEN
 --MWLLLVTVCFIHMSGNAFCFLGKI-AKNPEASMNVSQMITSYWGYPSEMHKVITADGYILQVYRIPHGKNNANH

KGPKPVVFLQ--HGLLADSSNWNVTNLANSLSLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMA
 KGPKPVVYLQGEHGFLADSSNWNVTNIDNNSLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEYWAFSFDEMA
 TGQRPVVFLQ--HGLLASATNWI SNLPNNSLAFILADAGYDVWLGNSRGNTWARRNLYSPDSVEFWAFSFDEMA
 IGKRPVVYLQ--HGLIASATNWI ANLPNNSLAFMLADAGYDVWLGNSRGNTWSRKNVYSPDSVEFWAFSFDEMA
 LGQRPVVFLQ--HGLLGSATNWI SNLPKNSLGFLLADAGYDVWLGNSRGNTWAQEHLYSPDSPEFWAFSFDEMA

KYDLPASINFI LNKTGQEQVYYVGHSGQTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHL
 KYDLPASINYILNKTGQEQLYNVGHSGQCTIGFIAFSQMPPELAKKVKMFFALAPVLSLNFASGPMVKLGRLPDLL
 KYDLPATIDFIVKKTGQKQLHYVGHSGQTTIGFIAFSTNPSLAKRIKTFYALAPVATVKYTKSLINKLRFVPQSL
 KYDLPATINFIVQKTGQEKIHYVGHSGQTTIGFIAFSTNPTLAKKIKTFYALAPVATVKYTQSPLKKISFIPFTFL
 EYDLPSTIDFILRRTGQKQLHYVGHSGQTTIGFIAFSTSPTLAEKIKVFYALAPVATVKYTKSLFNKLALIPHFL

IKDLFGDKFELPQSAFLKWLGTHTVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNM SRVDVYTTTHSPAGTSVQNMHLHWSQ
 LEDLFGQKQFLPQSAMVWLSTHICTHVIMKELCANIFFLICGFNEKNLNM SRVDVYTTTHCPAGTSVQNMVHWTQ
 FKFIFGDKLIFYPHNFFDQFLATEVCSREMLNLLCSNALFIICGFDSKNFNTSRLDVYLSHNPAGTSVQNMFWHTQ
 FKLMTGKMFPLPHTYFDDFLGTEVCSREVLDDLCSNTLFIICGFDKKNLNVSRFDVYLGHNPAAGTSVQDFLHWAQ
 FKIIFGDKMFYPHTFLEQFLGVEMCSRETLDVLCKNALFAITGVDNKNFNMSRLDVYIAHNPAGTSVQNTLHWRQ

AVKFKQFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSSGGHDWLADVDVNI LLTQITNLV FHESIPEWE
 VVKYHKLQAFDWGSSDKNYFHYNQSYPPLYSIKDMQLPTALWSSGGKDWLADTSDINILLTEIPTLVYHKNIPEWD
 AVKSGKFQAYDWGSPVQNRMHYDQSQPPYNTAMNVP IAVWNGGKDLLADPQDVGLLLPKLPNLIYHKEIPFYN
 LVRSGKFQAFNWGSPSQNMLHYNQKTPPEYDVSAMTVPVAVWNGGNDILADPQDVAMLLPKLSNLLFHKEILAYN
 AVKSGKFQAFDWGAPYQNLMHYHQPTPIYNLTAMNVP IAVWSADNDLLADPQDVDFLLSKLSNLIYHKEIPNYN

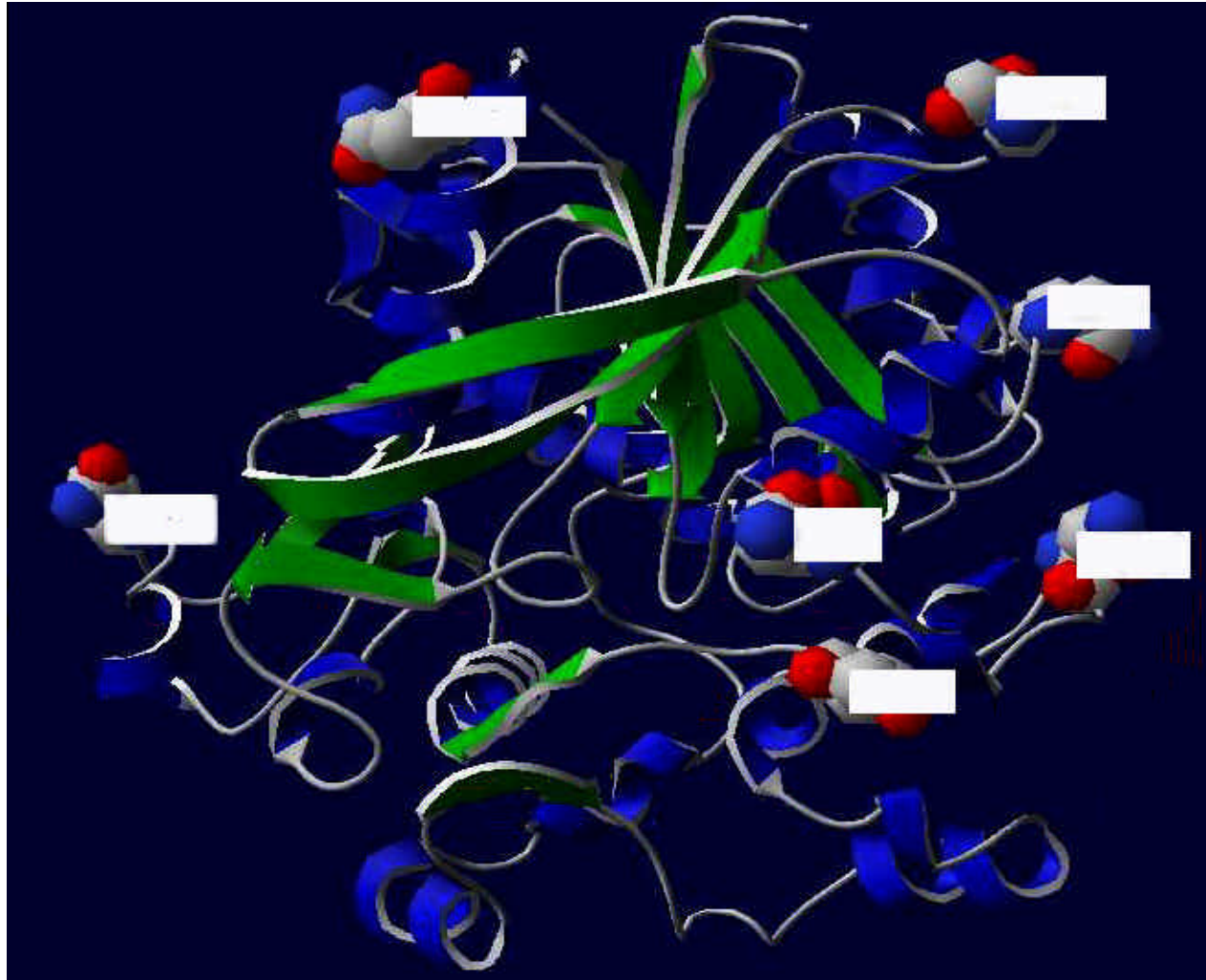
HLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ- humane lysosomale Lipase (hLAL)
 HLDFIWGLDAPWRLYNEVVSMLMKKYQ- lysosomale Lipase der Ratte (rLAL)
 HLDFIWAMDAPQEVYNDIVSMISEDKK humane gastrische Lipase (hGL)
 HLDFIWAMDAPQEVYNEMISMMAED-- linguale Lipase der Ratte (rLL)
 HLDFIWAMDAPQEVYNEIVSLMAEDKK bovine prägastrische Esterase (bPE)

b.

Ident.(%)	hLAL	rLAL	hGL	rLL	bPE
Protein	100	74,9	59,4	58,6	54,7
DNA	100	75,5	59,8	59,2	58,3

Abb. 5. Verwandtschaft der sauren Lipasen. a. Sequenzvergleich der sauren Lipasen; 1: Ala1 der lysosomalen Lipase und N-Terminus; eingerahmt: das Pentapeptid G-X-S-X-G um das katalytisch aktive Ser; Cysteine sind fett hervorgehoben. b. Homologien: zugrunde gelegt wurden für den Proteinvergleich die Polypeptidsequenzen, für den DNA-Vergleich die längsten überlappenden cDNA-Sequenzen.

Aus **Abb. 5** ist der Grad der Homologie zwischen vier sauren Lipasen ersichtlich. Die ausgeprägte Homologie sowie die Identität von über 50% zwischen den Lipasen erlaubt vergleichende Aussagen und die Beschreibung eines Modells für die lysosomale Lipase basierend auf Daten der humanen gastrischen Lipase.



Die Strukturanalyse der humanen gastrischen Lipase weist das Serin als Teil der katalytischen Triade aus. Diese besteht aus S147, H353 und D324 bzw. E324 und liegt im Innern des Moleküls. Serin wird von einer Helix aus ungefähr 30 Aminosäuren bedeckt, die das „lid“ bilden. In Anwesenheit eines Lipid-Substrates öffnet es sich und legt die katalytische Triade frei; dabei entsteht das „oxyanion hole“, das durch Wasserstoffbrückenbindungen mit zwei NH-Gruppen die Reaktion stabilisiert. Nur in diesem Zustand ist eine Interaktion zwischen Enzym und Substrat möglich (Roussel *et al.*, 1999). Vermutlich erfolgt die Substratbindung bei der lysosomalen Lipase auf dem gleichen Weg.

1.6.2. Domänen der lysosomalen Lipase

Die lysosomale Lipase wurde aus humaner Leber (Warner *et al.*, 1981), Rattenleber (Brown u. Sgoutas, 1980), Kaninchenleber (Imanaka *et al.*, 1984), humaner Plazenta (Burton, 1980), Lunge (Brooks u. Weinhold, 1986) sowie aus dem Kulturmedium von Fibroblasten (Sando u. Rosenbaum, 1985) isoliert. Ausreichende Mengen für die Bestimmung der Peptidsequenz und eine Klonierung der cDNA des Enzyms wurden 1991 gewonnen. Die geringe Expressionsrate der lysosomalen Lipase im Gewebe sowie ihre Instabilität und Hydrophobizität machten lange Zeit biochemische Untersuchungen des Enzyms unmöglich. Anderson und Sando gelang es, die cDNA der lysosomalen Lipase zu klonieren (Anderson u. Sando, 1991).

Das Gen der lysosomalen Lipase (LIPA) ist auf Chromosom 10q 23.2 lokalisiert (Anderson *et al.*, 1993). Es setzt sich aus 10 Exons mit einer Größe von 39 bis 1487 Basenpaaren und 9 Introns zusammen. Die kodierende Region beginnt in Exon 2 und endet in Exon 10. Die 1255 Basenpaare umfassende untranslatierte 3'-Region ist nicht von Introns unterbrochen und stellt den größten Teil des Exon 10 dar. Die partielle Intron/Exon-Organisation ist in **Abb. 6** dargestellt.

1. Einleitung



Abb. 6. Übersicht der Exon-Intron-Struktur der lysosomalen Lipase. Die Größe der einzelnen Exons ist darüber bzw. darunter angegeben (kursiv). Die Intron-Länge wurde mittels Hybridisierung und Restriktionskartierung abgeschätzt (R. Knoblich, Dissertation 1998).

Die cDNA der lysosomalen Lipase hat eine Länge von 2626 Nukleotiden (**Abb. 7**). Am 5'Ende der kodierenden Region von 1200 Nukleotiden befindet sich ein nicht-translatierter Bereich von 144 Basenpaaren, am 3'Ende schließt sich ein nicht-translatierter Bereich von 1255 Basenpaaren an; dort ist auch ein Poly(A)-Schwanz von 27 Basen lokalisiert. Über die Nukleotide 2428 bis 2433 erstreckt sich ein Polyadenylierungssignal (AATAAA). In Position +1 und +7 des offenen Leserahmens sind zwei Methioninkodons enthalten, wobei das ATG-Triplett bei +1 wahrscheinlich als Initiationskodon im Rahmen der Translation fungiert. Die lysosomale Lipase weist eine Signalsequenz von 27 Aminosäuren an ihrem N-terminalen Ende auf. Die hydrophobe Signalsequenz sorgt für den Transport des Enzyms vom Ribosomen zum Endoplasmatischen Reticulum (ER). Kotranslational wird das naszierende Polypeptid in das ER übertragen und die Signalsequenz abgespalten. Die lysosomale Lipase weist außerdem ein vermutetes Propeptid mit 49 Aminosäuren auf. Propeptide dienen vermutlich der Proteinstabilisierung, leisten einen Beitrag zur korrekten Faltung und stellen ein zusätzliches Signal für die Proteinsortierung dar. Die Abspaltung des Propeptids erfolgt erst im Prälysosom (Kornfeld, 1986). Dies erklärt möglicherweise, daß nach einer Aufreinigung der lysosomalen Lipase aus humaner Leber zwei aktive Formen der lysosomalen Lipase von 55 kDa und 41 kDa erhalten werden. N-terminale Sequenzierungen dieser beiden Formen ergaben, daß die mature lysosomale Lipase mit A1 bzw. G50 beginnt (Ameis *et al.*, 1994).

Die Numerierung der Aminosäuren der humanen lysosomalen Lipase aus Lebergewebe steht im Widerspruch zu Aussagen von Anderson und Sando, nach denen der Serinrest in Position 6 als die erste Aminosäure der reifen Fibroblastenlipase gilt; diese beruhen auf Homologien mit der humanen gastrischen Lipase (Anderson u. Sando, 1991). In der vorliegenden Arbeit wird die Numerierung der Aminosäuren der humanen

hepatischen lysosomalen Lipase verwendet, da diese auf Mikrosequenzierungen der lysosomalen Lipase aus humaner Leber beruhen (Ameis *et al.*, 1994). Die Größe des Enzyms beträgt nach dieser Zählweise 372 Aminosäuren.

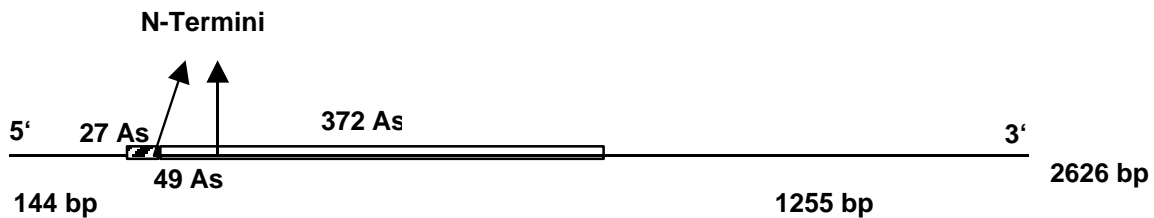


Abb. 7. Struktur der cDNA der lysosomalen Lipase. Es fanden sich eine 145 bp lange, 5' nicht kodierende Region, ein offener Leserahmen für 399 Aminosäuren, eine 3' nicht kodierende Region von 1255 bp und ein 27 bp langer Poly(A)-Trakt. Die gesamte cDNA umfaßte 2626 bp. Der offene Leserahmen kodierte für ein Signalpeptid von 27 Aminosäuren (schraffierte Box) und ein Protein mit Propeptid bzw. abgespaltenem Propeptid, welches 49 Aminosäuren umfaßt.

1.6.3. Struktur motive

Die Primärsequenz der lysosomalen Lipase enthält Motive, die möglicherweise bei ko- und posttranslationalen Modifikationen eine Rolle spielen. Dazu gehören Erkennungssequenzen für Kinasen, Cysteinreste und Erkennungssequenzen für die Glykosylierung (**Abb. 8**).

1.6.3.1. Phosphorylierungsstellen

Die lysosomale Lipase ist kein „house keeping“ Enzym, sondern ihre Expression unterliegt zumindest einer geringen Regulation. So könnte eine Substratregulation auftreten. Bei steigendem Angebot von Cholesterolestern wird mehr Enzym in den Lysosomen benötigt. Übersteigt jedoch die Lipidmenge in den Lysosomen einen bestimmten Grenzwert, erfolgt nur eine reduzierte Translation der mRNA der lysosomalen Lipase und es kommt zu einer Abnahme der Enzymkonzentration (Hajjar, 1994).

Die Existenz von Erkennungsstellen für Proteinkinasen, die reversible Phosphorylierungen katalysieren, deutet ferner auf eine mögliche Regulation der Expression der lysosomalen Lipase hin. Die Sequenz der lysosomalen Lipase weist vier Konsensussequenzen (S/T-X-R/K) für die Proteinkinase C auf (Kishimoto *et al.*, 1985).

1. Einleitung

Außerdem findet man vier Konsussequenzen für die Caseinkinase II (S/T-Asp/Glu-D/E) (Pinna, 1990) und eine Konsussequenz für die Tyrosinkinase (R/K-x-D/E-X-Y) (Patschinsky *et al.*, 1982).

Darüberhinaus wird angenommen, daß die zytoplasmatische (neutrale) Cholesterolester-Hydrolase (NCEH) durch Phosphorylierung einer cyclischen AMP-abhängigen Proteinkinase aktiviert wird (Hajjar, 1994). Experimentelle Daten liegen hierzu nicht vor.

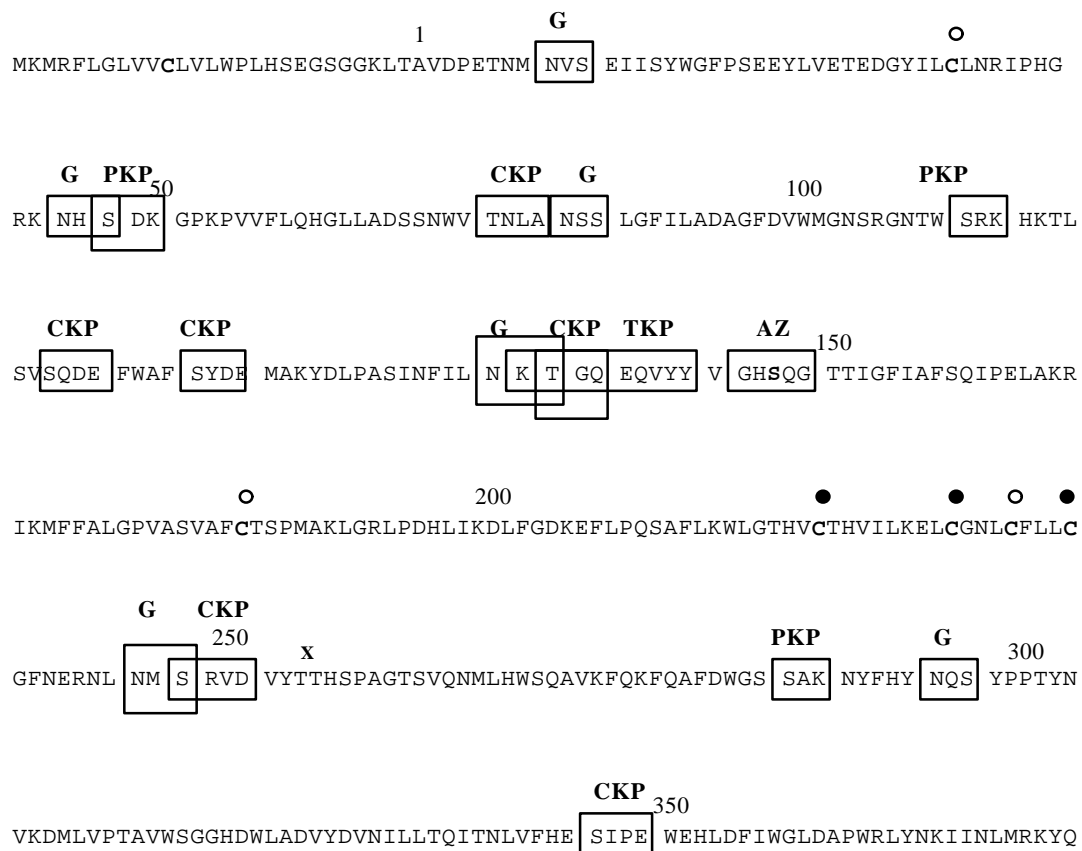


Abb. 8. Struktur motive auf der Polypeptidsequenz der lysosomalen Lipase.

G: N-Glykosylierungsstelle; x: O-Glykosylierungsstelle; PKP: Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle;

CKP: Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle; TKP: Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle;

AZ: Aktives Zentrum; ● :konservierter Cysteinrest; ○ :nicht-konservierter Cysteinrest

1.6.3.2. Cysteinreste/Disulfidbrücken

Freie Sulfhydrylgruppen in Proteinen zeichnen sich durch eine hohe Nukleophilie aus. Durch die Bildung von Disulfidbrücken können Cysteinreste eine maßgebliche Rolle bei der Faltung und Stabilität von Proteinen spielen und haben damit eine essentielle Bedeutung für die Funktion des Proteins.

Die Sequenz der lysosomalen Lipase weist sechs Cysteinreste auf: C35, C182, C221, C230, C234 und C238. Im Vergleich mit den übrigen sauren Lipasen sind C221 und C231 in allen Vertretern konserviert. Die Cysteinreste C35, C182 und C234 sind ausschließlich in der humanen lysosomalen Lipase zu finden.

Aus Daten einer Röntgenstrukturanalyse von rekombinanter HGL, exprimiert mit Hilfe eines Baculovirussystems, wurde eine Disulfidbrücke zwischen C227 und C236 ermittelt. C244 ist ungebunden (Canaan *et al.*, 1999). Eine zielgerichtete Mutagenese der entsprechenden Cysteinreste in humaner saurer lysosomaler Lipase ergab deutlich geringere Werte für die Aktivität dieser Mutanten im Vergleich zu den Mutanten der anderen Cysteinreste bzw. Wildtyp-Enzym (Lohse *et al.*, 1997b). Damit kann eine Disulfidbrücke zwischen den konservierten Cysteinresten (C221-C231; nach Nomenklatur der eigenen Arbeitsgruppe für die lysosomale Lipase) als gesichert gelten.

1.6.3.3. Glykosylierung

Proteine können eine oder mehrere Oligosaccharidseitenketten besitzen. Die Funktion dieser teilweise voluminösen Seitenketten ist mannigfaltig. Sie dienen der Sortierung und Stabilisierung. Daneben sind Proteine beschrieben, in denen die Glykosylierung kotranslational bei der Faltung mitwirkt und essentiell für die Ausbildung eines intakten und aktiven Konformers ist (Paulson, 1989); (Opdenakker *et al.*, 1993); (Van den Steen *et al.*, 1998). Es gibt drei Arten, wie Kohlenhydrate kovalent an Proteine gebunden sein können:

1. N-glykosidisch: In N-Glykoproteinen wird der Oligosaccharidrest an die Seitenkette eines Asparaginrestes gebunden. Alle N-Glykoproteine besitzen ein peptidgebundenes Pentasaccharid-Fragment, das als Core-Region bezeichnet wird. Für die Ausbildung dieser Bindung gibt es eine Konsensussequenz: Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann.

1. Einleitung

2. O-glykosidisch: In O-Glykoproteinen ist der nicht-reduzierende Rest einer Oligosaccharidseitenkette an die OH-Gruppe mit der Seitenkette einer Aminosäure, meistens Serin oder Threonin, des Proteins gebunden. Eine Core-Region existiert ebensowenig wie eine Konsensussequenz.
3. an Ethanolaminphosphat gebunden: Dieser Bindungstyp zwischen Protein und Kohlenhydratresten tritt bei Glykosylphosphatidylinositolen, genannt GPI-Anker, die für die Verankerung von Proteinen in Zellmembranen verantwortlich sind, auf. Dieser Bindungstyp spielt für lysosomale Enzyme vermutlich keine Rolle.

1.6.3.3.1. Biosynthese der N-Glykane

Die Biosynthese der N-Glykane beginnt mit dem Phosphodolichol-Zyklus im RER. Dabei wird ein Core-Oligosaccharid von der ER-Membran über einen Dolicholphosphatträger auf einen Asparaginrest übertragen. Durch verschiedene Glykosyltransferasen werden weitere Zuckerreste auf die wachsende Zuckerkette übertragen. Vom RER schnüren sich anschließend Vesikel ab, die die Proteine zum cis-Golgi-Apparat transportieren (**Abb. 9**). In den verschiedenen Golgi-Kompartimenten wird der Zuckeranteil getrimmt, und es werden weitere Zuckerreste angefügt, wobei hauptsächlich Mannose, N-Acetylglukosamin, Galaktose und Sialinsäure gebunden werden. Die reifen Zuckermoleküle werden nach mannosereichen, phosphoryliert mannosereichen, phosphoryliert gemischten und komplexen Oligosacchariden unterschieden.

Die Glykosylierung lysosomaler Enzyme spielt für die intrazelluläre Sortierung eine besondere Rolle (Paulson, 1989). Im Trans-Golgi-Apparat werden mehrere Mannosereste pro Polypeptidmolekül durch eine spezifische N-Acetylglukosamin-Phosphotransferase und eine Phosphodiesterase an C6 phosphoryliert. Die Phosphotransferase erkennt lysosomale Proteine an einem dreidimensionalen Strukturmotiv, in dem vermutlich Lysinreste essentiell sind, die in einer definierten Konformation zueinander stehen (Cuozzo u. Sahagian, 1994). Lysosomale Enzyme werden von spezifischen Rezeptoren (Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren) gebunden und vom Golgi-Kompartiment zu den Prälysosomen transportiert (Kornfeld u. Mellman, 1989). In diesem Kompartiment dissoziieren Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und glykosylierte Proteine. Die Lysosomen schnüren sich von dem Prälysosom ab.

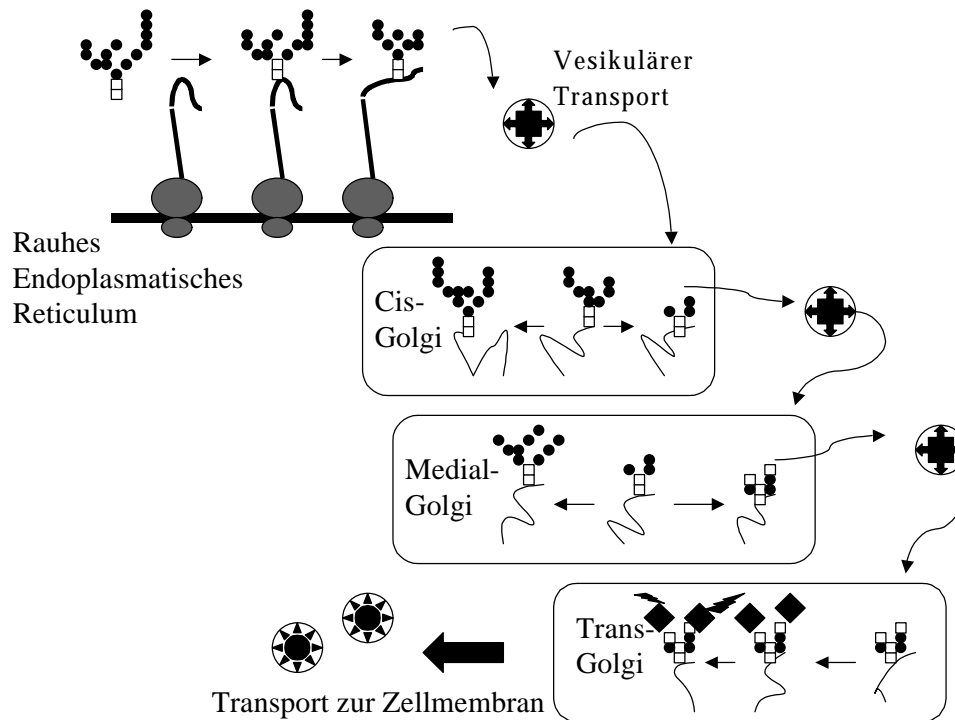


Abb. 9. Schematische Darstellung der N-Glycan-Biosynthese. Sie findet in Zell-Organellen statt, dem Rauhen Endoplasmatischen Reticulum (RER) und den Kompartimenten (cis, medial und trans) des Golgi-Apparates. Modifiziert nach: (Lindhorst, 2000).

Eukaryotische Zellen benötigen N-gebundene Zucker zum Überleben. Mäuse, denen die N-acetyl-glucosaminyltransferase I fehlt und die damit eine defekte Synthese hybrider und komplexer N-gebundener Zuckerreste aufweisen, sterben nach 9,5-10,5 Tagen ihrer embryonalen Entwicklung. Dieses Ergebnis belegt die essentielle Rolle der N-Glykosylierung bei höheren Lebewesen (Ioffe u. Stanley, 1994).

1.6.3.3.2. Biosynthese der O-Glykane

Die Biosynthese der O-Glykane erfolgt anders als die der N-Glykane und folgt keinem allgemeinen Schema (Van den Steen *et al.*, 1998). Die Glykosylierung des gesamten Peptids erfolgt im Golgi-Apparat. Meistens startet sie mit dem Transfer eines N-acetylgalaktosamins. Der Glykan-Rest wird verlängert und durch andere Glykosyltransferasen verzweigt, die mindestens sechs verschiedene Core-Klassen der verschiedenen O-Glykane ausbilden. L-Fucose, Sialinsäuren oder Galaktose-Reste sind häufig an der Peripherie gebunden. Die O-Glykosylierung tritt bevorzugt bei nukleären und zytoplasmatischen Proteinen auf (Comer u. Hart, 2000).

1.6.3.3.3. Glykosylierung der lysosomalen Lipase

Die lysosomale Lipase enthält sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine O-Glykosylierungsstelle. Die Konsensussequenz für N-gebundene Zucker, Asn-X-Ser/Thr (Dwek *et al.*, 1993), findet man in der Sequenz der lysosomalen Lipase bei N9, N45, N74, N134, N246 und N294. Bei der Reinigung der humanen lysosomalen Lipase aus Lebergewebe wurde ein Molekulargewicht von 56 kDa in der SDS-PAGE registriert. Das errechnete Molekulargewicht der Lipase liegt jedoch bei 42,4 kDa. Die Differenz wird auf die ausgeprägte N-Glykosylierung der Lipase zurückgeführt (Ameis *et al.*, 1994). Daran beteiligt könnte auch eine O-Glykosylierung sein. Potentiell wird T255 der lysosomalen Lipase an seiner OH-Gruppe glykosyliert (Gupta *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit werden das Ausmaß und die Funktion der Glykosylierung für die lysosomale Lipase biochemisch untersucht. Außerdem sollen erste Daten für die Funktion des Propeptids bei der lysosomalen Lipase gesammelt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Glycerin-tri-(9,10(n)-³H)-oleat (Amersham); Cholesterol-(1-¹⁴C)oleat (Amersham), Acrylamid (BioRad); Ammoniumpersulfat (BioRad); Aquasol (Packard); Bactoagar (Difco); Bactotrypton (Difco); BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce), Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA) (Serva); 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) (Sigma); Bromphenolblau (Sigma); Desoxynukleotide (Roche); DIG Glycan Differentiation Kit (Roche); Dimethylsulfoxid (Sigma), Dithiothreitol (DTT) (Gibco); Enhanced Chemiluminescence Detection Reagents (ECL) (Amersham); Ethidiumbromid (Sigma); Imidazol (Sigma); LipofectinTM (Gibco); β -Mercaptoethanol (Sigma); Neutralrot (Sigma); Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen); Nonidet NP-40 (Sigma); Phosphatidylcholin (BioRad); Piperazindiacrylamid (PDA) (BioRad); Plasmid Mini und Maxi Kit (Qiagen); Proteinase K (Roche); ProtranTM Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher&Schuell); Qiaex Gel Extraction Kit (Qiagen); SeaKEM Agarose (FMC); N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (BioRad); Triolein (Sigma); Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (BioRad); Triton X-100 (BioRad); Tunicamycin (Roche); Yeast-Extrakt (Difco).

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen. Es wurde jeweils *p.a.* Qualität verwendet. Das verwendete Wasser war bidestilliert. Alle wässrigen Lösungen, die für Klonierungen, Sequenzierungen, Transfektionen und PCR-Reaktionen verwendet wurden, wurden zuvor durch Filtration (0,22 μ m) sterilisiert.

2.1.2. Plasmide/DNA

pBacPak8, BacPAK6 *Bsu36I*-digest (beides Clontech), Molecular Weight Standard VI und VIII (Roche). Oligonukleotide zur DNA-Amplifikation, Sequenzierung und zielgerichteter Mutagenese wurden von der Firma GenSet (Paris) bezogen.

2.1.3. Proteine/Enzyme

Rainbow-markers RPN 756 (Amersham); ECL protein M.W. RPN 2107 (Amersham); *DpnI* Restriktionsendonuklease (New England Biolabs); N-Glycosidase F (Roche), Neuraminidase (Roche); O-Glycosidase (Roche); *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene); *Taq* DNA Polymerase (Gibco); T4 Ligase (Gibco). Die nicht aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden von der Fa. Roche bezogen.

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des Prism Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.1.4. Antikörper

Als Erstantikörper wurde ein monoklonaler α -His₆-Antikörper aus der Spezies Maus von der Fa. Dianova verwendet. Der Zweitantikörper, polyklonales α -IgG-HRP aus Kaninchen mit dem Antigen IgG Maus, wurde von der Fa. Amersham bezogen.

2.1.5. Bakterienstämme und Zellen

Bakterien

<i>E. coli</i>	Stamm XL-1 blue, kompetente Zellen	Stratagene
<i>E. coli</i>	DH-5 α , kompetente Zellen	Gibco

Zellkulturen

<i>Sf9</i>	Ovarienzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	Invitrogen
------------	--	------------

kultiviert in T.C. 100 1x Medium mit 10% FBS für Insektenzellen und 1% Penicillin/Streptomycin (alles von Gibco)

K362	Fibroblastenzellen von Wolman-Patienten	M.Zeigler, Jerusalem
------	---	-------------------------

kultiviert in Dulbeccos modified eagle medium (DMEM) mit 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% HEPES-Puffer (Gibco)

2.1.6. Pufferlösungen und Medien/Agar

LB-Medium: 1% Bactotrypton, 0,5% Yeast-Extrakt, 0,5% NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgSO₄

Broth-Agar: 1,5% Bactoagar, 1% Bactotrypton, 0,5% Yeast-Extrakt, 0,5% NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgSO₄

SOC-Medium: 2% Bactotrypton, 0,5% Yeast-Extrakt, 0,005% NaCl, 0,4% Glucose, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

Phosphatgepufferte Salzlösung (Gibco)

1 x TBE-Puffer: 90 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8,0)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

6.6.2.-Puffer: 6 mM Tris-HCl, 6 mM NaCl, 0,2 mM EDTA (pH 8,0)

Äquilibrierungs- und Waschpuffer für Nickel/NTA-Aufreinigung:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,1% Triton X-100, 25% Ethylenglykol (pH 7,0)

Elutionspuffer für Ni/NTA-Aufreinigung:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,1% Triton X-100, 25% Ethylenglykol (pH 4,5)

TBS-T: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (pH 7,6)

2.1.7. Datenbanken und Internet

Zur Erstellung des Dendrogramms wurde der mips Proteinserver des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried mit folgender Internetadresse verwendet: <http://www.mips.biochem.mpg.de>. Die SwissProt-Datenbank wurde für die Erstellung des dreidimensionalen Modells der lysosomalen Lipase aus humaner gastrischer Lipase benutzt (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Die O-Glykosylierungsstelle der lysosomalen Lipase wurde mit Hilfe der O-Glycobase bestimmt (<http://www.cbs.dtu.dk>).

2.1.8. Geräte

Autoklav „Bioclav“ (Schütt); DNA-Sequencer (Perkin Elmer); Elektrophoresekammern (BioRad); Eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf); Szintillationszähler β -Counter (Packard); Semidry-Blottingapparatur fast blot B33 (Biometra); UV/VIS-Spektrophotometer Lambda 20 (Perkin Elmer); Thermocycler (Perkin Elmer); Ultraschallgerät Sonifier B12 (Branson); Ultra-Turrax T25 (Jahnke & Kunkel).

2.2. Methoden

2.2.1. Zielgerichtete Mutagenese

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Herstellung von Glykosylierungsmutanten der lysosomalen Lipase. Die lysosomale Lipase hat sechs potentielle N- und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle. Die Asparaginreste N9, N45, N74, N134, N246 und N294 des Wildtyp-Lipase-Baculovirusvektors pAPLALBacHis, die als Teil der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr *in vivo* potentiell glykosyliert sind, wurden dafür einzeln und in Kombination in Glutaminreste umgewandelt. T255 der potentiellen O-Glykosylierungsstelle wurde mittels zielgerichteter Mutagenese in Valin (V) umgewandelt.

Während der biochemischen Reinigung der lysosomalen Lipase aus humaner Leber wurden in allen Reinigungen zwei Formen des Enzyms mit unterschiedlichem Molekulargewicht beobachtet. Als Erklärung hierfür wurde eine Proteolyse zwischen den Aminosäureresten K49 und G50 nachgewiesen. Diese Aminosäuren wurden mittels zielgerichteter Mutagenese ausgetauscht. Es wurden die Mutanten K49R und G50A hergestellt. Diese beiden Mutanten sollen Auskunft über die Relevanz der vermuteten Prozessierungsstelle zwischen den genannten Aminopositionen geben. Die Herstellung der Deletionsmutante Δ 49 zur weiteren Analyse der proteolytischen Prozessierung der lysosomalen Lipase wird unter Punkt 2.3. beschrieben.

Die Konstruktion oben genannter Mutanten wurde mit Hilfe des site-directed mutagenesis kits (Stratagene) vorgenommen. Hierbei wurde das doppelsträngige Plasmid pAPLALBacHis in eine Amplifikation mit Oligonukleotiden eingesetzt, die in der Mitte

für den gewünschten Aminosäureaustausch kodieren. Dabei wurde das eine Oligonukleotid kodierend gewählt und das andere revers komplementär zum ersten. In einem zyklischen Temperaturprofil wurde das rekombinante Plasmid mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Die Dauer der Polymerisationsphase wurde auf die Plasmidgröße abgestimmt (2 min/kb Template). Bevor diese PCR-Produkte in *E. coli* transformiert wurden, erfolgte die Fragmentierung des nicht-mutierten Templates durch die Restriktionsendonuklease *DpnI*. Es wurden mehrere der entstandenen und gereinigten Plasmide sequenziert, wobei 60-100% der sequenzierten Klone die gewünschte Mutation trugen und die übrigen Klone nicht-mutierten Template-Plasmiden entsprachen.

Profil der Mutations-/Amplifikationsreaktion:

Segment	Zyklen	T (°C)	t(min)
1	1	96	5
2	16	96	0,5
		55	1
		68	13

Verwendete Oligonukleotide für die Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen (*):

N9Q-F:

5'-GCTGTGGATCCTGAAACAAACATGCAGGTGAGTGAAATTATCTCT-3'

N9Q-R:

5'-AGAGATAATTTCACTCACCTGCATGTTTGTTCAGGATCCACAGC-3'

N45Q-F:

5'-ATTCCTCATGGGAGGAAGCAACATTCTGACAAAGGTCCC-3'

N45Q-R:

5'-GGGACCTTTGTCAGAATGTTGCTTCCCATGAGGAAT-3'

N74Q-F:

5'-TGGGTCACAAACCTTGCCCAAAGCAGCCTGGGCTTCATT-3'

N74Q-R:

5'-AATGAAGCCCAGGCTGCTTTGGGCAAGGTTTGTGACCCA-3'

N134Q-F:

5'-TCCATTAACCTCATTCTGCAGAAAAGTGGCCAAGAACAAGTG-3'

2. Materialien und Methoden

N134Q-R:

5'-CACTTGTTCTTGGCCAGTTTTCTGCCAGAATGAAGTTAATGGA-3'

N246Q-F:

5'-GGATTTAATGAGAGAAATTTACCAGAGTTCTAGAGTGGATGTA-3'

N246Q-R:

5'-TACATCCACTCTAGACATCTGTAATTTCTCTCATTAAATCC-3'

N294Q-F:

5'-GCCAAGAATTATTTTCATTACCCAGCAGAGTTATCCTCCCACA-3'

N294Q-R:

5'-TGTGGGAGGATAACTCTGCTGGTAATGAAAATAATTCTTGGC-3'

Verwendete Oligonukleotide für die Mutagenese der O-Glykosylierungsstelle(*):

LAL-OGly-255-F:

5'-TCTAGAGTGGATGTATATACAGTTCATTCTCCTGCTGGAATTCT-3'

LAL-OGly-255-R:

5'-AGAAGTCCAGCAGGAGAATGAAACTGTATATACATCCACTCTAGA-3'

Verwendete Oligonukleotide für die Bildung der K49- und G50-Mutanten(*):

LAL-Lys-F-49:

5'-AGGAAGAACCATTCTGACCGGGTCCCAAACCAGTTGTC-3'

LAL-Lys-R-49:

5'-GACAACTGGTTTGGGACCCCGTCAGAATGGTTCTTCCT-3'

LAL-Gly-F-50:

5'-AGGAAGAACCATTCTGACAAAGCCCCCAAACCAGTTGTC-3'

LAL-Gly-R-50:

5'-GACAACTGGTTTGGGGGCTTTGTCAGAATGGTTCTTCCT-3'

(*Die Positionen der veränderten Basensequenzen sind unterstrichen.)

2.2.2. DNA Sequenzierung

Die Inserts der Klone pAPLALBacHis wurden vollständig sequenziert. Bei sämtlichen Klonen wurden die Stellen der Mutationen überprüft. Außerdem wurden die Übergänge und das Vorhandensein der AP-Leadersequenz und des Polyhistidinschwanzes überprüft.

Die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Teilstücke erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Applied Biosystems. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers mit folgendem Temperaturprofil für Einzelstrang-Templates gearbeitet:

<u>Zyklen</u>	<u>Zeit/Temperaturen</u>
1	5 min 94°C
25	30 sec 94°C / 15 sec 50°C / 4 min 60°C
halten	4°C

Grundlage ist die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), wobei es sich um eine Kettenabbruchmethode der Amplifikationsreaktion handelt, in der neben Desoxynukleotiden auch Didesoxynukleotide eingesetzt werden. Wird ein Didesoxynukleotid eingebaut, bricht die Polymerisierungsreaktion ab. Auf diese Weise bricht die Reaktion statistisch hinter jeder Base der Sequenz ab, so daß ein Gemisch entsteht, in dem alle möglichen Fragmentgrößen enthalten sind. Für die anschließende Detektion mit dem Kapillar-System 310, einem Laser-Detektor, müssen die Sequenzierprimer am 3'-Ende fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, sogenannte Dye-Terminatoren, enthalten. Die unterschiedlich großen DNA-Fragmente werden anhand ihrer Fluoreszenz detektiert. Die DNA-Sequenz der PCR-Produkte wird mittels rechnervermittelter Analyse bestimmt.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bac-1F:

5'-ACCATCTCGCAAATAAATAAG-3'

Bac-2R:

5'-ACAACGCACAGAATCTAGCG-3'

LAL-N9R-PRIM:

5'-GTTTCCCTCCAGACCCCTCAGAAT-3'

LAL-MIDF-PRIM:

5'-TTCCCTAGTGAGGAATACCTAG-3'

LAL-ENDF-PRIM:

5'-TTTGCACCTCATGTCATACTGAAGG-3'

LAL-RS4:

5'-TGATCTGGTAATCGTCCTAATTTG-3'

2.2.3. Klonierung

Zur Konstruktion des Expressionsplasmids wurde der Plasmidvektor pAPLALBacHis zunächst mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* linearisiert. Dadurch wurde die cDNA der lysosomalen Lipase aus dem Vektor herausgeschnitten. Der geschnittene Vektor wurde mittels Gel-Extraktion aus einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel isoliert, wobei nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) gearbeitet wurde. Der Vektor wurde abschließend noch mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Die Deletion $\Delta 49$ wurde mit Hilfe einer PCR-Amplifikation gebildet. Hierzu wurde die cDNA der lysosomalen Lipase als Template verwendet und mit den Primern LAL-D49-*NcoI* und LAL-RHis-*NotI* amplifiziert, so daß die ersten 49 Aminosäuren der lysosomalen Lipase im Endprodukt fehlten. Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Segment	Zyklen	T (°C)	t(min)
1	1	94	5
2	35	94	1
		55	1
		72	0,5
3	1	72	10

Für die Amplifikation der Deletionsmutanten-cDNA wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

LAL-D49-*Nco*I:

5'-ACTGCCATGGGGTCCCAAACCAGTTGTCTTCCTG-3'

LAL-Rhis-*Not*I:

5'-

ACGTGCGGCCGCTCAGTGATGGTGATGGTGATGCTGATATTTCTCATTAG
ATT-3'

Das PCR-Produkt wurde mit dem PCR-Purification Kit nach Anleitung der Firma Qiagen gereinigt. Abschließend wurde ein analytisches Agarosegel durchgeführt, um beurteilen zu können, ob es sich bei den Produkten um die gewünschten handelte.

Die geschnittene Vektor-DNA (*Nco*I-pBacPak8-*Not*I) und das Insert-PCR-Produkt (*Nco*I-Δ49-LAL-His-*Not*I) wurden für vier Stunden bei 16°C mit 1 U T4 Ligase beim eingesetzten Verhältnis von Vektor zu Δ49LALcDNA 1:3 mit max. 200 ng eingesetzter Vektor-DNA-Menge zusammengegeben. Daran schloß sich die Transformation in DH-5α-kompetenten Zellen nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) an. Die gewonnenen Klone wurden isoliert, kultiviert und nach DNA-Präparationen wie oben beschrieben sequenziert.

2.2.4. Expression der lysosomalen Lipase mit dem Baculovirussystem

2.2.4.1. Kultur der *Spodoptera frugiperda*-Zellen (*Sf9*-Zellen)

Sf9-Zellen, Ovarialzellen des Insekts *Spodoptera frugiperda*, wurden in T.C.100 1x-Medium kultiviert, das 10% fötales Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin enthält. Die Kulturen wurden bei 27°C ohne CO₂-Zufuhr inkubiert und jeweils bei Subkonfluenz passagiert.

2.2.4.2. Kotransfektion der rekombinanten Plasmid-DNA mit Baculovirus-DNA

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurden *Sf9*-Zellen mit 4 ml T.C. 100 1x-Medium (mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin) in 35mm-Kulturschalen bis zur Subkonfluenz inkubiert. Es wurde das Transfektionsgemisch aus 5 µl mutagenisierter DNA der lysosomalen Lipase (0,1 µg/µl), 5 µl BacPAK6/*Bsu36I* und 50 µl Lipofectin™ Reagenz (0,1 mg/ml) und einer Emulsion kationischer Liposomen hergestellt, mit sterilem bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt, gemischt und 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Mediums und Zugabe von 1,5 ml T.C. 100 1x-Medium ohne Zusätze wurden die Lipid-DNA-Komplexe tropfenweise auf die Zellen gegeben und 5 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgezogen und durch 3 ml serumhaltiges Medium ersetzt. Der Kotransfektionsüberstand wurde 4 Tage und 6 Tage nach der Transfektion geerntet. Die Überstände wurden bis zur Plaquereinigung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4.3. Isolierung rekombinanter Viren (Plaquereinigung)

Zur Herstellung klonaler Virusstocks aus dem Kotransfektionsüberstand wurden Plaquereinigungen durchgeführt (O'Reilly *et al.*, 1994). Subkonfluent gewachsene *Sf9*-Zellen wurden in 60mm-Schalen mit jeweils 100 µl von Verdünnungen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) des Kotransfektionsüberstandes infiziert. Nach 1 h wurde das Inokulum abgezogen und mit 5 ml eines 0,5%igen Agarose-Overlays, bestehend aus 0,75 g Agarose in 15 ml bidestilliertem Wasser, die nach Autoklavieren und Abkühlung auf 50°C mit 135 ml ebenfalls auf 50°C temperiertem Insekten-Vollmedium (T.C. 100 1x-Medium mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin) versetzt wurden, überschichtet. Nach Erstarren des Overlays wurden die Schalen 5 Tage bei 27°C inkubiert. Zur Visualisierung der Plaques wurde nach den 5 Tagen ein zweites Agaroseoverlay über den ersten gelegt, welches zusätzlich 50 µg/ml Neutralrot enthielt. Nach drei- bis viertägiger Inkubation bei 27°C waren die Plaques als konzentrische, nicht-gefärbte Kreise sichtbar, die sich von dem angefärbten vitalen Zellrasen abhoben. Es wurden 10 Plaques pro Mutation mit sterilen Pasteurpipetten isoliert, und das Virus wurde über Nacht in 200 µl Vollmedium aus der Agarose eluiert. Abschließend wurden 800 µl Vollmedium hinzugegeben; die Virusstocks wurden sterilfiltriert.

2.2.4.4. Identifikation und Amplifikation der rekombinanten Viren

Viren aus klonalen Plaques wurden mit Hilfe einer PCR daraufhin überprüft, ob sie in ihrem Genom die cDNA der lysosomalen Lipase enthielten. Dafür wurden zunächst subkonfluent gewachsene *Sf9*-Zellen in P60-Schalen mit 100 µl Viruseluat aus den klonalen Plaques infiziert. Nach 4 Tagen wurde der Überstand geerntet und als Passage 1-Virusstock (P1) bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden in 1 ml PBS abgeschabt, bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 250 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum Aufschluß der Zellen wurden 250 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 5% β-Mercaptoethanol; 0,4% SDS) und 12,5 µl 10 mg/ml Proteinase K zugegeben und 30 min bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde zur Abtrennung der Proteine dreimal mit 500 µl Phenol/Chloroform (50:50) extrahiert. Schließlich wurde die DNA aus der wäßrigen Phase mit 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,6) und 1 ml Ethanol gefällt (-20°C; 30 min). Das Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. 10 µl davon wurden in die PCR eingesetzt.

Mit einem Oligonukleotid, das an die Polyhedrin-Promotor DNA-Sequenz bindet (Bac1 F) und mit einem Oligonukleotid, das an die cDNA der lysosomalen Lipase bindet (LAL RS4), wurde ein 787 bp großes DNA-Stück amplifiziert, sofern die DNA der lysosomalen Lipase in das Virus kloniert worden war. Dies wurde gelelektrophoretisch dokumentiert.

Ein Virus-Plaque enthält durchschnittlich 10^{10} Viruspartikel. Zur Gewinnung hoher Titer erfolgten sukzessive Amplifikationsschritte ausgehend vom P1 Stock mit aufsteigenden Volumina.

2.2.4.5. Expressionsexperimente

Zur Expression wurden Monolayer-Kulturen aus 8×10^6 *Sf9*-Zellen eingesetzt. Nach drei Amplifikationen (P3) war der Virus-Titer so hoch, daß bei Transfektion mit 6 ml P3 alle Zellen 4 Tage nach der Transfektion lysiert waren. Vor Zugabe des hochtitrigen Inokulums wurde das Komplett-Medium abgezogen. Drei Stunden später wurde das Inokulum abgezogen, die Kultur mit serumfreien Medium gewaschen und für 4 Tage in serumfreien Medium gehalten. Anschließend wurde dem Zellkulturüberstand nach

Trennung von den Zellen 25% (v/v) Ethylenglykol und 0,1% (v/v) Triton X-100 zur Stabilisierung des Enzyms zugegeben und direkt weiterverarbeitet. Für die Messung der intrazellulären Aktivität der lysosomalen Lipase wurden die Zellen nach der Zentrifugation mit kaltem PBS gewaschen und in Lysispuffer (10 mM Natriumazetat, pH 5,0; 0,1 mM DTT, 1% Triton X-100) aufgenommen. Zum Aufschluß der Zellen wurden sie auf Eis sonifiziert (10%, 20 Strokes, Branson Sonifier); die Aktivität der lysosomalen Lipase wurde aus diesem Zellextrakt bestimmt.

2.2.4.6. Reinigung der lysosomalen Lipase aus Zellkulturüberstand

2.2.4.6.1. Nickel-Affinitätschromatographie

Aus den Zellkulturüberständen konnte die exprimierte Lipase aufgrund der Histidinreste am C-Terminus mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Ni²⁺-NTA Matrix wurde von der Firma Qiagen bezogen, und für eine Reinigung wurden zunächst 9 Volumina des verwendeten Matrix-Volumens mit Puffer äquilibriert. Zu dem mit Ethylenglykol und Triton X-100 angereicherten 38 ml Zellkulturüberstand wurden 3 ml der äquilibrierten Ni²⁺-NTA Suspension zugegeben. Die Reinigung erfolgte über eine „Batch“-Prozedur. Das Gemisch aus Zellkulturüberstand und Matrix wurde 2 h bei 4°C schwach geschüttelt. Anschließend wurde die Ni²⁺-NTA Agarose in eine Säule überführt. Nachdem die Matrix gepackt worden war, wurde sie 7 x mit dem doppelten Matrixvolumen gewaschen. Die Lipase wurde in drei Fraktionen à 2 ml Elutionspuffer eluiert.

2.2.4.6.2. Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentrationen der Lipase-Lösungen wurden mit Hilfe der Bicinonischen Säure bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Dieses Reagenz ist unempfindlich gegenüber den verwendeten Mengen an Triton X-100 und Ethylenglykol. Es wurde ein Kit der Firma Pierce nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Reaktion wurde bei 60°C für 30 min durchgeführt. Als Standard wurde bovines Serum-Albumin (Fraktion V) eingesetzt.

2.2.4.6.3. Inhibition der Glykosylierung mit N-Methyldeoxynojirimycin und 1-Deoxymannojirimycin

Zur Hemmung der Glykosylierung wurden dem T.C.100 1x-Medium 1 mM N-Methyldeoxynojirimycin oder 1 mM 1-Deoxymannojirimycin zugefügt. Als Kontrolle wurde eine Wildtyp-Lipase Expression ohne die Inhibitoren durchgeführt. Nach der Ernte der Zellen wurden Medium und Zellen getrennt, die Zellen lysiert und die Aktivität des Enzyms von aufgereinigtem Medium und lysierten Zellen gemessen.

2.2.4.6.4. Untersuchung der O-Glykosylierung

Zur Untersuchung der O-Glykosylierung der Wildtyp-Lipase wurde der DIG Glycan Differentiation Kit von der Fa. Roche verwendet. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers unter Verwendung von Peanut agglutinin (PNA) vorgegangen. PNA erkennt das Core-Disaccharid Galaktose $\beta(1-3)$ N-acetylgalaktosamin und ist somit für die Erkennung der O-Glykosylierung geeignet. Bei substituierten Disacchariden ist es nötig, durch Zugabe von Neuraminidase die Substitutionsgruppe abzuspalten, weshalb ein Ansatz mit 0,2 μ g Wildtyp-Lipase mit 5 mU Neuraminidase über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Als Kontrollprotein wurde Asialofetuin verwendet. Die Detektion beruht auf der spezifischen Bindung von Lektinen an Carbohydrat-Resten. Das Lektin ist hierbei mit einem Steroid-Hapten Digoxigenin konjugiert, was die immunologische Erkennung der gebundenen Lektine nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran ermöglicht.

2.2.4.6.5. Deglykosylierung mit O-Glykosidase, Neuraminidase und N-Glykosidase F

2 μ g gereinigte Wildtyp-Lipase wurden über Nacht bei 37°C einzeln und einmal gemeinsam mit jeweils 9 U N-Glykosidase F (PNGase F), 5 mU Neuraminidase und 2,5 mU O-Glykosidase inkubiert. Zur Deglykosylierung des nativen Proteins wurde dieses im Elutionspuffer der Affinitätschromatographie eingesetzt. Um eine vollständige Deglykosylierung zu ermöglichen, wurde das Protein zunächst in 1% SDS und 0,5% Nonidet-P40 20 min bei 96°C denaturiert und anschließend wie das native Protein

behandelt. Dann wurden die Ansätze auf ein Polyacrylamidgel geladen; nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das Protein immunologisch detektiert.

2.2.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dafür wurden die Proben 5 min bei 95°C in 3x Probenpuffer denaturiert (final: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5% (v/v) Glycerin; 2% SDS; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau). Im Sammelgel (4% Acrylamid/0,107% PDA; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,0375% Ammoniumpersulfat; 0,125% (v/v) TEMED) wurden die Proben auf eine schmale Lauffront gebracht und in dem darunter anschließenden Trenngel (12,5% Acrylamid/0,334% PDA; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS) der Größe nach getrennt. Kathoden- und Anodenpuffer bestanden aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 380 mM Glyzin; 0,1% SDS.

2.2.4.8. Silberfärbung

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Trenngel in 25% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Eisessig für mindestens 30 min fixiert. Daran schloß sich ein 30 min Schütteln in Sensitizing-Lösung an (30% (v/v) Ethanol; 1,25 mg/ml Glutardialdehyd; 12,6 mM Natriumthiosulfat; 0,83 M Natriumazetat). Anschließend wurde 3 x 15 min mit Wasser gewaschen, bevor das Gel in der Silberlösung (15 mM Silbernitrat; 37% (v/v) Formaldehyd) für 20 min im Glasgefäß geschüttelt wurde. Es wurde 2 x 1 min gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in einer Lösung aus 23,5 mM Natriumcarbonat; 37% (v/v) Formaldehyd für 5-8 min. Die Reaktion wurde mit 41,7 mM EDTA gestoppt. Nach 10 min wurde das Gel 3 x 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend dokumentiert oder in einer Lösung aus 30% (v/v) Ethanol und 4% (v/v) Glycerin konserviert.

2.2.4.9. Immundetektion, Western Blot

Die zu analysierenden Proben wurden zunächst in einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und einem Elektrotransfer unterzogen. Es wurde ein Semi Dry Blot System

mit diskontinuierlichen Puffern (Kathode: 47,5 mM Borsäure, pH 9; 5% Methanol; Anode: 40 mM Borsäure, pH 9; 20% Methanol) verwendet. Es wurde mit 1 mA/cm² für 2 h auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h in PBS/3% BSA geblockt. Anschließend wurde sie 30 min in PBS mit 2 mg/ml BSA und 100 mM EDTA gewaschen, womit überschüssige Ni²⁺-Ionen durch den Komplexbildner EDTA gebunden und von der Membran entfernt wurden. Danach wurde die Membran mehrfach für 5-15 min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit einem monoklonalen Anti His₆ (α-His₆)-Antikörper (1:200 verdünnt in TBS) erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach erneutem Waschen (s. oben) wurde mit einem HRP (Meerrettich Peroxidase) konjugierten α-IgG-HRP (1:1000 in TBS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederherum mehrfach mit TBS-T gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL Systems (Enhanced Chemoluminescence). Dabei wurde durch die Umsetzung von Luminol und H₂O₂ durch HRP Chemilumineszenz mit einem Maximum bei 428 nm emittiert, die auf einem Autoradiographiefilm sichtbar gemacht wurde. Es wurde ein Kit der Fa. Amersham verwendet, in dem sämtliche Reagenzien zur Detektion in zwei Lösungen enthalten sind. Die Exposition der Blots war bei 45 s optimal.

2.2.5. Enzymatische Aktivität und Kinetik der lysosomalen Lipase

Zur Charakterisierung wurde die Aktivität bei Wildtyp und sämtlichen Mutanten der lysosomalen Lipase gegenüber Triolein und zum anderen gegenüber Cholesteryloleat gemessen. Die lipolytische Aktivität wurde mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate gemessen. Da es keine standardisierte Methode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der lysosomalen Lipase gibt, wurden die Assays individuell optimiert.

2.2.5.1. Trioleinhydrolyse

Herstellung der Substratstammlösung

Zur Messung der lipolytischen Aktivität gegenüber Triolein wurde zunächst ³H-markiertes Glycerin-tri-(9,19(n)-³H)-oleat von freien Fettsäuren durch eine Flüssigkeitschromatographie mit Petrolether/Diethylether gereinigt. Dies wurde in Anlehnung an

eine Methode von Nilsson-Ehle und Schotz durchgeführt, die diese für die LPL entwickelten (Nilsson-Ehle u. Schotz, 1976). Zu 2,5 mCi ^3H -Triolein wurden 25 mg nicht-radioaktives Triolein (100 mg/ml in Benzol) und unter Stickstoff zur Trockne abgedampft. Der Rest wurde in 2 ml Petrolether gelöst und auf eine Säule mit 2 g Siliciumgel und darüberliegendem 0,2 g Florisil, suspendiert in Petrolether, geladen. Um freie Ölsäure abzutrennen, wurde die feste Phase der Säule mit 50 ml Petrolether gewaschen und das Triolein mit 50 ml einer 5%igen Lösung aus Diethylether in Petrolether in fünf Fraktionen eluiert. Die zwei Fraktionen mit den höchsten Radioaktivitätswerten wurden vereinigt, mit Stickstoff getrocknet und in 5 ml Benzol aufgenommen.

Zur Herstellung der Substratstammlösung wurden zu der radioaktiven Lösung 32 mg nicht-radioaktives Triolein (100 mg/ml in Benzol) gegeben und das Gemisch getrocknet. Nach Zugabe 12,5 g wasserfreien Glycerins wurde das Gemisch für 5 min mit einem Ultra-Turrax bei 7000 Umdrehungen pro Minute verrührt. Die Substratstammlösung ist bei Raumtemperatur für ungefähr drei Monate verwendbar. Danach ist die Menge an freier, radioaktiver Ölsäure für eine genaue Auswertung zu hoch.

Messung der lipolytischen Aktivität

Im Meßansatz wurden zu 25 μl der Probe 75 μl eiskaltes 0,109 M Natriumazetat (pH 5,0) pipettiert. Dazu wurden 100 μl Substrat zugegeben, so daß 0,27 mM Triolein und 0,25% Triton X-100 vorlagen (Messieh *et al.*, 1983). Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch alkalische Verseifung mit einem Puffer aus 0,1 M Borsäure, 0,1 M Natriumcarbonat (pH 10,5) gestoppt. Das nichtumgesetzte Substrat sowie die wasserunlöslichen Di- und Monoglyzeride wurden mit einem Gemisch aus organischen Lösungsmitteln (Chloroform:Methanol:Heptan 1,25:1,41:1, v/v/v) extrahiert (Belfrage u. Vaughan, 1969). Aus der wäßrigen Phase wurde die Menge an freigesetzter und verseifeter Ölsäure bestimmt und die enzymatische Aktivität der lysosomalen Lipase berechnet.

2.2.5.2. Cholesteryloleat-Hydrolyse

Es wurde nach der Vorschrift von Haley und Mitarbeitern gearbeitet (Haley *et al.*, 1980), die modifiziert wurde.

Herstellung des Substrates

Als Substratstock wurde ein Gemisch aus 250 μCi (4,64 μmol) Cholesteryl(^{14}C)oleat (spezifische Aktivität: 53,9 mCi/mmol) und 43,8 μmol nicht-radioaktivem Cholesteryloleat in 10 ml Hexan angesetzt und bei -20°C gelagert. Zur Aktivitätsbestimmung von 20 Proben der lysosomalen Lipase wurden 0,2 ml dieser Stammlösung mit 0,2 ml 16 mM Phosphatidylcholin in Chloroform gemischt und im Stickstoffstrom getrocknet. Der feste Rückstand wurde in 2 ml einer Lösung aus 2 mM Taurocholat, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA und 0,005% (v/v) Triton X-100 aufgenommen (finale Konzentration: 161,4 μM Cholesteryloleat) und zweimal mit je zehn Pulsen bei halbmaximaler Leistung und Raumtemperatur sonifiziert, um eine Emulsion aus Lipidmizellen herzustellen.

Messung der lipolytischen Aktivität

Die Reaktion wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 300 μl durchgeführt, wobei darin 50 μl Probe und 150 μl 0,1 M Natriumazetatpuffer (pH 5,0) enthalten waren. Die Reaktionsgemische wurden 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 3 ml eines organischen Extraktionspuffers (Benzol:Chloroform:Methanol 1:0,5:1,2 (v/v/v) und 0,1 M Ölsäure) und 0,6 ml 0,3 M Natriumhydroxid gestoppt (Pittman *et al.*, 1975). Aus der wäßrigen Phase wurde die Menge an freigesetzten und verseiften Fettsäuren bestimmt und die enzymatische Aktivität der lysosomalen Lipase berechnet.

2.2.5.3. Bestimmung der Kinetik der lysosomalen Lipase

2.2.5.3.1. Variation der Substratkonzentration

Das durch die Standard-Enzymbestimmung bestimmte Eluat mit der höchsten lipolytischen Aktivität wurde zunächst auf 1 μg Protein pro 25 μl mit Elutionspuffer verdünnt. Das vorbereitete Tagessubstrat wurde in absteigender Reihe mit 100 μl , 75 μl , 50 μl , 25 μl und 10 μl zu den Proben gegeben und dabei soviel eiskaltes 0,109 M Natriumazetat, pH 5,0 zugegeben, daß das Gesamtvolumen von 200 μl erreicht wurde. Danach wurden die Assays wie unter 2.5.1. und 2.5.2. beschrieben durchgeführt.

2.2.5.3.2. Variation der Enzymmenge

Das Enzym mit 1 µg pro 25 µl wurde in absteigender Reihenfolge von 25 µl, 20 µl, 15 µl, 10 µl bis 5 µl mit soviel eiskaltem 0,109 M Natriumazetat, pH 5,0 aufgefüllt, daß nach Zugabe von 50 µl des Tagessubstrates der Ansatz 200 µl Gesamtvolumen betrug. Anschließend wurde wie unter **2.5.1.** und **2.5.2.** beschrieben inkubiert und gemessen.

2.2.6. Versuch zur Aufnahme rekombinanter lysosomaler Lipase in LAL-defiziente Fibroblasten von Wolman-Patienten

2.2.6.1. Zellkultur

Die Fibroblastenzelllinie K362 wurde in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in Adhäsionskultur gehalten. Dabei wurde das Medium mit 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% HEPES-Puffer komplettiert, und es wurde mit Trypsin-EDTA (Gibco) passagiert.

2.2.6.2. Zugabe lysosomaler Lipase zu LAL-defizienten K362-Fibroblastenzellen

Die K362-Zellen wurden in 100 mm² Petrischalen kultiviert. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und zur Konfluenz wachsen gelassen. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µg aus Sf9-Zellen aufgereinigter lysosomaler Lipase in filtersterilisiertem (Zellulose-Nitrat-Filter, 0,45 µm, Millipore), serumfreiem DMEM-Medium mit 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,0) und 1 mg/ml BSA. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 2,5 h bei 37°C und 5% CO₂, bevor einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin die Zellen abgelöst wurden und aus dem Zellextrakt die Aktivität der lysosomalen Lipase bestimmt wurde. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Zugabe lysosomaler Lipase untersucht. Diese Methode beruht auf einer Veröffentlichung von Sando und Neufeld. Die Autoren verwendeten das lysosomale Enzym α-L-Iduronidase auf kultivierten humanen Fibroblasten, um die Aufnahme des Enzyms zu verfolgen. α-L-Iduronidase war nicht rekombinant aus Insektenzellen gewonnen worden, sondern aus menschlichem Urin (Sando u. Neufeld, 1977).

3. Ergebnisse

Da die Menge lysosomaler Lipase, die in früheren Untersuchungen aus humanem Lebergewebe gewonnen wurde, für biochemische Untersuchungen nicht ausreichend war, wurde zur rekombinanten Herstellung lysosomaler Lipase das Insektenzellen-/Baculovirus-Expressionssystem benutzt. In die cDNA der Lipase wurden Mutationen eingefügt, und die mutierte DNA wurde mittels homologer Rekombination in einen Baculovirusvektor transferiert (**Abb. 10**). Die Mutationen wurden durch DNA-Sequenzierung nachgewiesen. Hier werden die Herstellung der Mutanten, ihr Nachweis und ihre Expression, sowie die Reinigung der rekombinanten Lipase bzw. ihrer Mutanten aus dem Zellkulturmedium beschrieben. Die Proteine wurden im Silbergel und im Immunoblot mit einem monoklonalen anti-His₆-Antikörper nachgewiesen. Die hierbei erzielten Daten erlauben Aussagen zur Glykosylierung der Lipase durch Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der verschiedenen Mutanten. Weiterhin wird die Charakterisierung der Propeptid-Deletionsmutante und der Mutanten am Übergang vom Propeptid zum murenen Protein dargestellt.

In Aufnahmeexperimenten wurde rekombinante lysosomale Lipase zu einer Lipase-defizienten Fibroblastenzelllinie gegeben. Hierbei wurde untersucht, ob rezeptor-vermittelte Endozytose des Enzyms nachweisbar ist und ob es zur Korrektur der Lipasedefizienz kommt.

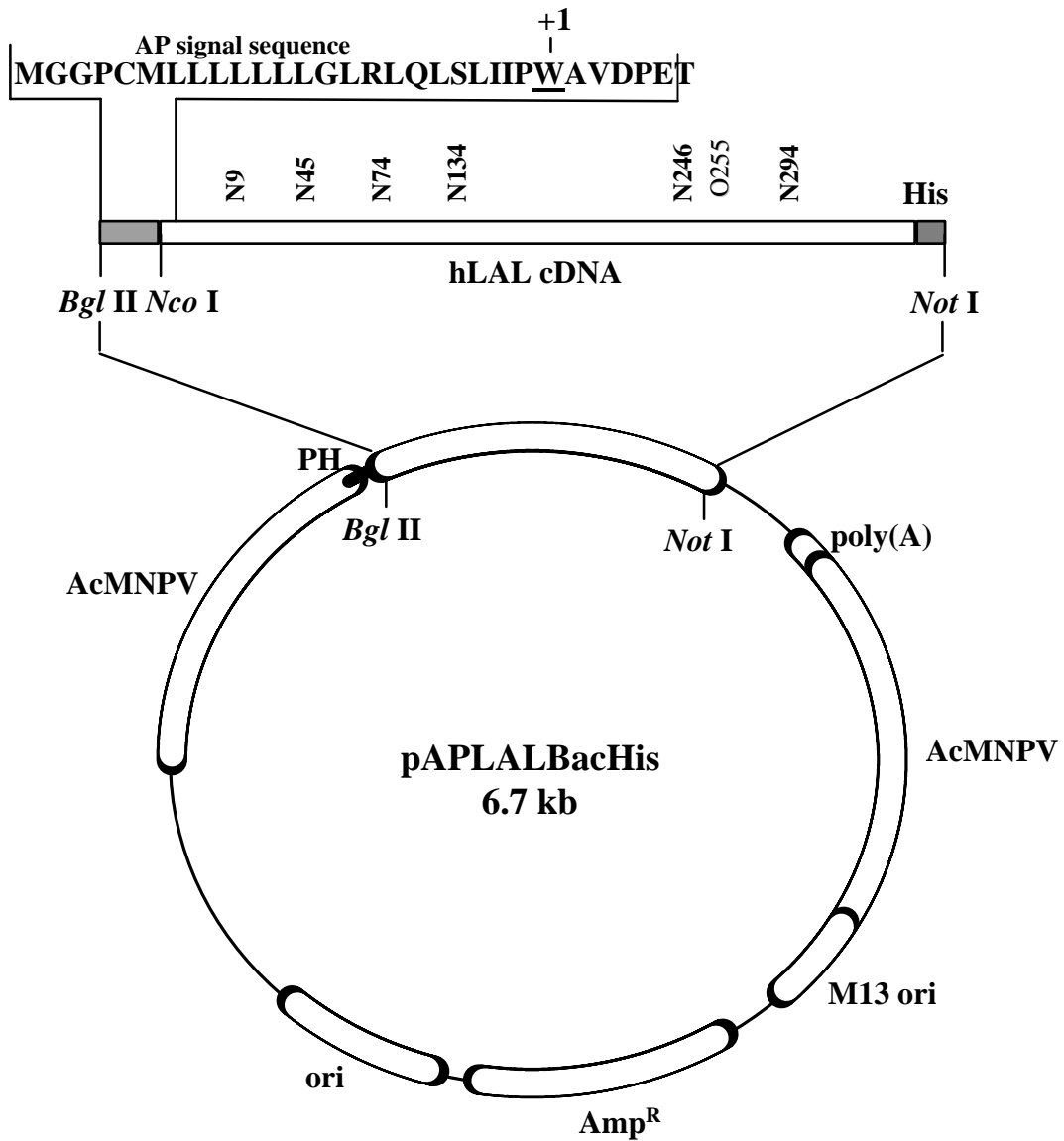


Abb.10. Konstrukt APLALBacHis zur Expression der lysosomalen Lipase mit Histidin-Tag (LAL-His) und veränderter Signalsequenz in Insektenzellen. AP: Signalsequenz der alkalischen Phosphatase; poly(A): Polyadenylierungsstelle des Polyhedrinpromoters; AcMNPV: homologe Rekombinationssequenzen des Baculovirus; M13ori: Replikationsursprung des M13 Phagen; Amp^R: Ampicillin-Resistenz-Gen; ori: Replikationsursprung; PH: Promotor des Polyhedringens. Die sechs potentiellen N- und eine mögliche O-Glykosylierungsstelle(n) sind angegeben.

3.1. Zielgerichtete Mutagenese

3.1.1. N-Glykosylierungsmutanten

Die lysosomale Lipase hat sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die Asparaginreste N9, N45, N74, N134, N246 und N294 der Wildtyp-Lipase cDNA wurden zunächst einzeln in Glutaminreste umgewandelt. Es wurde Glutamin gewählt, weil es Asparagin strukturell und chemisch sehr ähnlich ist, so daß aufgrund der Mutagenese keine Veränderungen in Struktur und Eigenschaft des Proteins auftreten sollten. Grundlage der Konstrukte war in allen Fällen der Vektor pAPLALBacHis. Nach Einbau der Mutationen wurden die Sequenzen zunächst mittels DNA-Sequenzbestimmung überprüft (**Abb. 11**).

Darüberhinaus wurden Doppelmutanten mit folgenden Kombinationen hergestellt:

(1) N9Q/N45Q, (2) N9Q/N74Q, (3) N9Q/N294Q, (4) N45Q/N74Q, (5) N45Q/N294Q und (6) N74Q/N294Q (Sequenzen nicht abgebildet). Doppelmutanten in Kombination mit N134Q und N246Q wurden nicht hergestellt, da bei diesen Mutationen keine Proteinbildung nachweisbar war (s. **3.5.1.**).

3.1.2. O-Glykosylierungsstelle und Übergang Propeptid/matures Protein

Das Threonin der potentiellen O-Glykosylierungsstelle (T255) wurde mittels zielgerichteter Mutagenese in Valin umgewandelt (**Abb. 12**). Valin ist dem Threonin stöchiometrisch ähnlich; Valin ist jedoch im Gegensatz zum Threonin etwas voluminöser und enthält keine polare Seitenkette. Dies könnte Auswirkungen auf das Gesamtprotein haben. Unter den 20 Aminosäuren gibt es zu Valin jedoch keine Alternative.

Während der biochemischen Reinigung der lysosomalen Lipase aus humaner Leber wurden in allen Reinigungen zwei Formen des Enzyms mit unterschiedlichem Molekulargewicht registriert. Als Erklärung hierfür wurde eine Proteolyse zwischen den Aminosäureresten K49 und G50 als wahrscheinlich erachtet. Diese Aminosäuren wurden mutagenisiert (K49R; G50A). Die Sequenzen nach erfolgreicher Mutagenese zeigt ebenfalls **Abb. 12**. Arginin ist Lysin chemisch sehr ähnlich, jedoch etwas voluminöser. Alanin unterscheidet sich von Glycin nur durch eine Methylgruppe anstelle eines Wasserstoffatoms und sollte deshalb zu keinen Veränderungen in der Proteinstruktur

3. Ergebnisse

führen, so daß diese Mutation Auskunft über die Relevanz der vermuteten Prozessierungsstelle geben sollte.

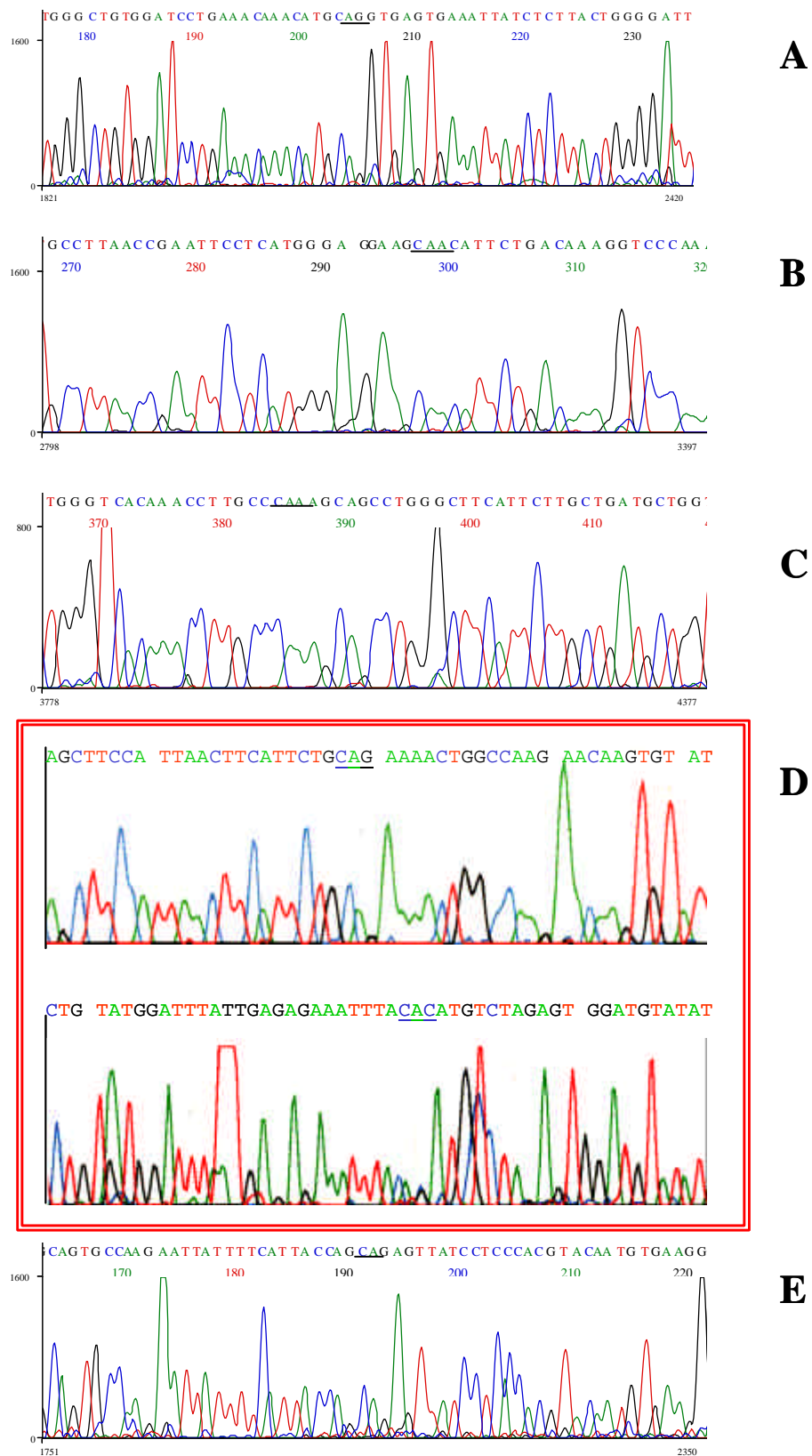
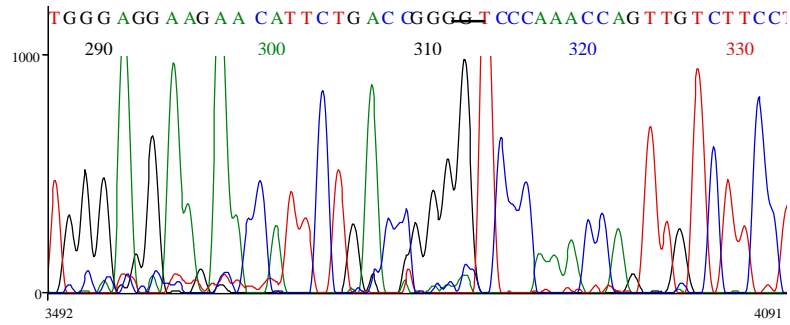
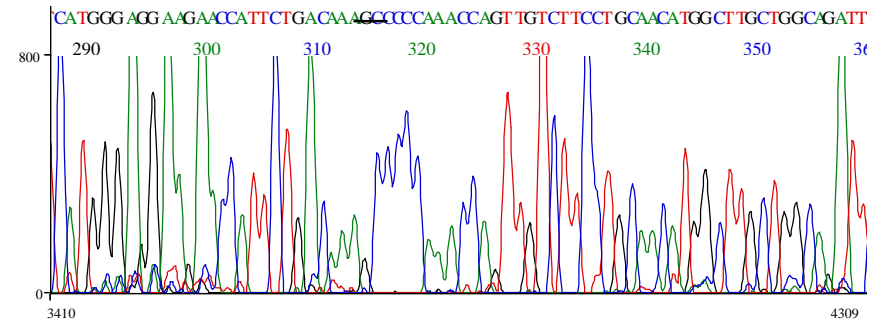


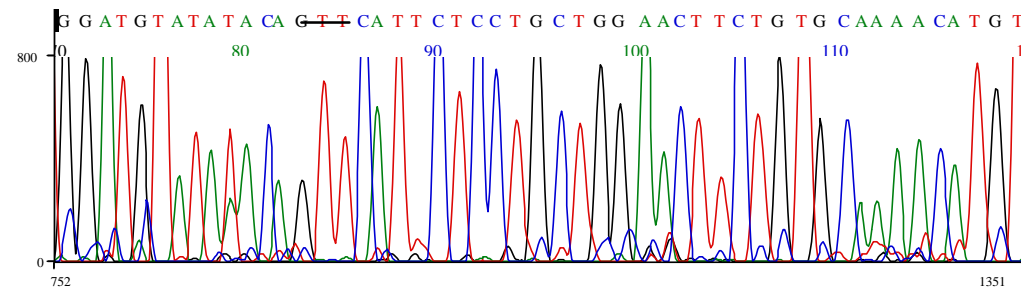
Abb. 11. DNA-Sequenzanalyse der N-Glykosylierungseinfachmutanten. A: N9Q; B: N45Q; C: N74Q; D: N134Q und N246Q; E: N294Q. Die beiden Mutanten im Rahmen (D) bilden kein Protein.



K49R



G50A



O-Glykosylierungsmutante

Abb. 12. Sequenzanalyse der K49R, G50A und der O-Glykosylierungsmutante.
Die Positionen der Mutationen sind unterstrichen.

3.2. Klonierung der $\Delta 49$ -Mutante

Die Mutante $\Delta 49$ der lysosomalen Lipase wurde mit Hilfe einer PCR-Amplifikation erzeugt. Dafür wurde die cDNA der kompletten lysosomalen Lipase als Matrix und die Oligonukleotide LAL-D49-*Nco*I und LAL-Rhis-*Not*I verwendet. Aus dem Plasmidvektor pAPLALBacHis wurde die cDNA der kompletten lysosomalen Lipase mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nco*I und *Not*I herausgeschnitten, um sie durch die deletierte cDNA zu ersetzen. Sowohl PCR-Produkt als auch geschnittene Vektor-DNA wurden auf ein Agarosegel geladen. Das Ergebnis zeigt **Abb. 13**.

Aus dem Gel isolierte und aufgereinigte Vektor-DNA (*Nco*I-pBacPak8-*Not*I) und Insert-PCR-Produkt (*Nco*I- $\Delta 49$ -LAL-His-*Not*I) wurden ligiert und transformiert. Die gewonnenen Klone wurden nach DNA-Präparation sequenziert. Die Sequenz eines positiven Klons ist aufgrund der Länge der Sequenzierung im Anhang wiedergegeben. Zum Vergleich findet man dort auch die nicht-mutagenisierte pBacPak8-LAL-Sequenz im Deletionsbereich.

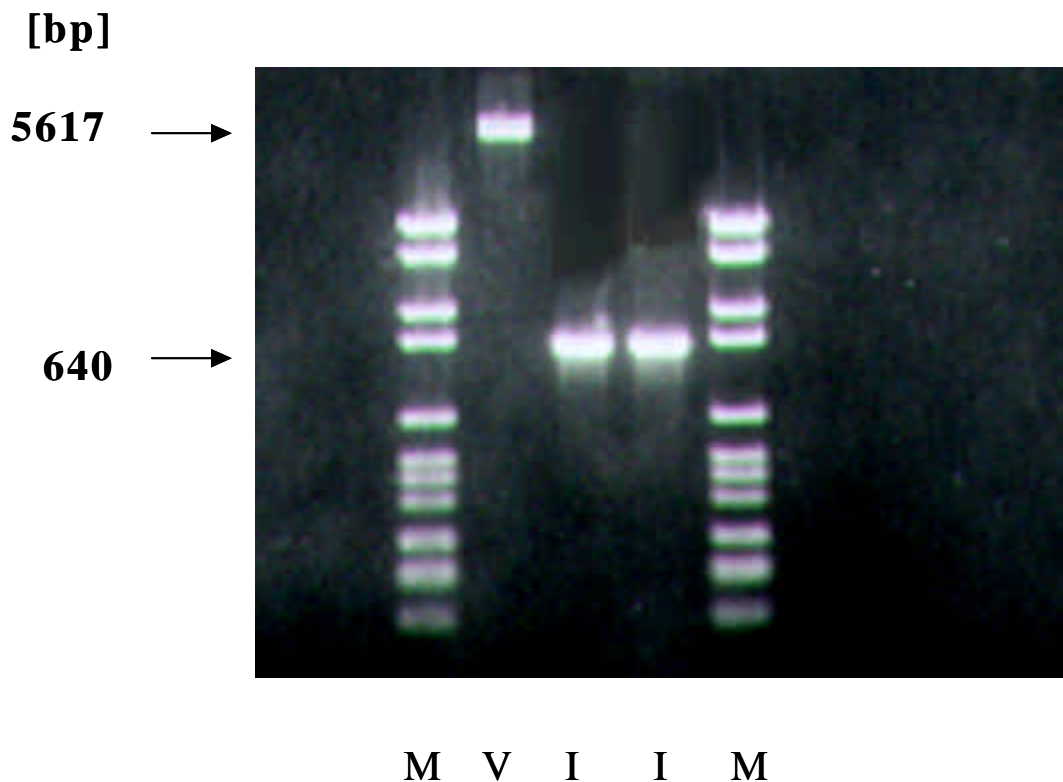


Abb. 13. Analytisches Agarosegel von Vektor und Insert für die $\Delta 49$ -LAL-Mutante.
 Nach Ausschneiden der LAL-His aus dem Expressionsplasmid pAPLALBacHis ergab sich eine neue Vektor-DNA-Größe (V) von 5617bp. Es wurden zwei $\Delta 49$ -LAL-PCR-Produkte (I) geladen. Die amplifizierten PCR-Produkte wiesen eine Länge von 640bp, die dem gewünschten Insert entsprach, auf. Der Marker (M) ist Molecular Weight Standard VI (Roche).

3.3. Expression der lysosomalen Lipase in Insektenzellen

Durch homologe Rekombination zwischen den AcMNPV-Sequenzen des Vektors und der Virus-DNA entsteht ein rekombinantes Baculovirus, das die kodierende Region der cDNA der lysosomalen Lipase am Genort des Polyhedrinproteins trägt. Die homologe Rekombination tritt nur mit einer Frequenz von 10^{-6} auf und ist somit der limitierende Schritt bei der Herstellung der rekombinanten Viren. Bei der Kotransfektion von Virus und Virusvektor entsteht eine gemischte Population aus rekombinanten, replikationsfähigen Viren. Um klonale Virusstocks zu isolieren, die die cDNA der lysosomalen Lipase am Genort des Polyhedrin tragen, wurde eine Plaquereinigung mit den Kotransfektionsüberständen durchgeführt. Aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe war bekannt, daß eine Expressionsdauer von vier Tagen die größtmögliche Menge an lysosomaler Lipase im Zellkulturüberstand ergibt. Aufgrund der AP-Leadersequenz, die die natürliche Signalsequenz ersetzt, wird das Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert. Daher wurde der Kotransfektionsüberstand für vier Tage auf *Sf9*-Zellen gegeben, anschließend der Überstand (P1-Virusstock) geerntet und aus den Zellextrakten die cDNA der lysosomalen Lipase gewonnen. Mittels PCR wurde überprüft, ob die Viren tatsächlich die cDNA der lysosomalen Lipase und seiner Mutanten enthielten (**Abb. 14**).

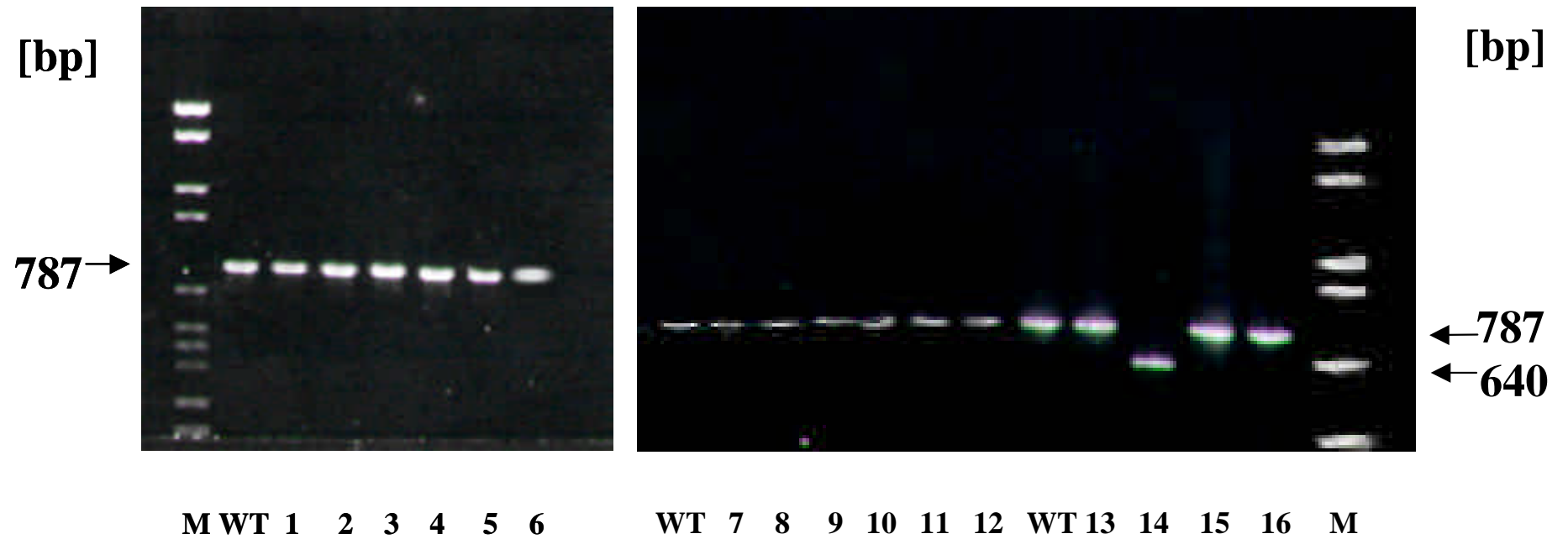


Abb. 14. Analytische DNA-Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten isolierter Virusplaques der Mutanten.
 Hierfür wurde das Primerpaar Bac1F-LALRS4 gewählt. M:Marker; WT:Wildtypenzym; 1-6: N-Glykosylierungs-Einfachmutanten;
 7-12: N-Glykosylierungs-Doppelmutanten; 13: K49R; 14: Δ 49-Mutante; 15: G50A; 16: O-Glykosylierungsmutante

3.4. Reinigung der lysosomalen Lipase über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Wie unter 3.3. beschrieben, waren Menge und Aktivität der lysosomalen Lipase im Zellkulturüberstand größer als im Zellextrakt. Daher wurde die Reinigung des Enzyms aus dem Zellkulturüberstand vorgenommen. Das Prinzip der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie beruht auf der Affinität von Histidinresten zu Nickelionen. Zur Reinigung der lysosomalen „His-markierten“ Lipase (LAL-His) unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde eine Agarosematrix verwendet, an die in hoher Konzentration Nitrilotriessigsäure (NTA) gebunden ist. NTA ist in der Lage, Ni²⁺-Ionen hochaffin zu binden und vier der sechs oktaedrisch angeordneten Ligandenplätze am Ni²⁺-Zentralion zu besetzen. Für die Reinigung von Proteinen mit einem Histidin-Tag wird die hohe Affinität der Imidazolringe benachbarter Histidine ausgenutzt (Abb. 15).

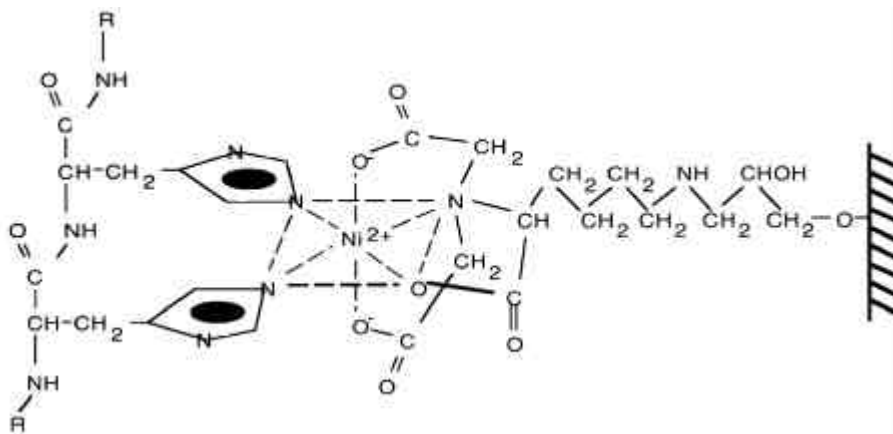


Abb. 15. Ni²⁺- Komplex mit NTA und zwei Histidinen eines Histidin-Tags.
NTA: Nitrilotriessigsäure

Ein modifiziertes Protein mit C-terminaler Verlängerung aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten kann durch Bindung an drei Ni²⁺-Zentralionen effektiv und spezifisch aus Proteinlösungen an die Matrix gebunden werden (Bindungskonstante: $K_B=10^8$, pH 8,0). Nach der Bindung des Proteins an die Ni²⁺-NTA-Säule werden die übrigen Proteine durch Waschen entfernt. Prinzipiell können Proteine auf zwei Arten von der Matrix eluiert werden: entweder durch steigende Konzentrationen an Imidazol, durch die histidinhaltige Proteine kompetitiv verdrängt werden, oder durch Absenkung des pH-Wertes. Bei sinkendem pH-Wert wird eine zunehmende Anzahl von Histidinresten

protoniert. Die Imidazolringe verlieren damit ihre aromatisch-planare Struktur und die Fähigkeit, Ni^{2+} zu komplexieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die lysosomale Lipase durch einen pH-Shift nach 4,5 von der Säule eluiert (zum Vergleich: pH-Wert des Zellkulturüberstands: 6,5). Das pH-Optimum der lysosomalen Lipase liegt bei pH 4,5, weshalb sich bei diesem Enzym die Elution mit Hilfe eines pH-Shiftes anbot. Besonders vorteilhaft für die lysosomale Lipase ist die Reinigung mit Hilfe der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie auch deshalb, weil sie durch hohe Konzentrationen an Detergentien, die zur Stabilisierung dieses Enzyms notwendig sind (25% Ethylenglykol, 0,1% Triton X-100), nicht gestört wird.

Nach Herstellung der P3-Virusstocks wurde die Expression der Lipase, wie unter **2.4.5.** beschrieben, durchgeführt. In einer „Batch“-Prozedur wurde die lysosomale Lipase aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Da die Konzentration der Lipase im Zellkulturmedium noch immer gering war ($<100 \mu\text{g/ml}$), wurde die Ni^{2+} -NTA-Matrix zunächst für 2 h bei 4°C in dem Lipase-haltigen Zellkulturmedium schwach geschüttelt. Anschließend wurde die Matrix in eine Säule geschlämmt. Diese wurde 7mal mit einem Waschpuffer gewaschen, bevor die Lipase durch einen pH-Shift eluiert wurde. Alle Puffer enthielten 20 mM Imidazol, was die Stringenz der Bindung an die Matrix erhöhte. Die Reinheit der Eluate wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE visualisiert. Den immunologischen Nachweis, daß es sich bei den gereinigten Proteinen um die lysosomale Lipase und ihre Mutanten handelte, erbrachten Western Blots mit einem monoklonalen $\alpha\text{-His}_6$ Antikörper. Die Aktivitätsmessungen aufgereinigter lysosomaler Lipase mußten sich rasch an die Eluatgewinnung anschließen, da das Enzym sehr instabil ist. So verringert sich dessen Aktivität innerhalb einer Woche um 30%, wenn es bei -20°C gelagert wird.

3.5. Untersuchung der N-Glykosylierung der lysosomalen Lipase

3.5.1. Einfachmutanten der N-Glykosylierungsstellen

Nach Aufreinigung der sechs N-Glykosylierungsmutanten (N9Q; N45Q; N74Q; N134Q; N246Q und N294Q) wurden Aktivitätsmessungen dieser Mutanten und des Wildtyp-Enzyms, das in jedem Expressionsexperiment als Positivkontrolle galt, durchgeführt. Dabei wurde ^3H -markiertes Triolein und ^{14}C -markiertes Cholesteryloleat

verwendet. Es fiel auf, daß die prozentuale Aktivität, gemessen mit Cholesteryloleat, im Vergleich zum Wildtyp stets niedrigere Werte ergab als mit Triolein.

N9Q

Diese N-terminal lokalisierte N-Glykosylierungsmutante, die wie N45Q noch im Propeptid der lysosomalen Lipase lokalisiert ist, zeigte nur noch eine Triolein-Hydrolyse von 50% im Vergleich zum Wildtyp. Die Cholesteryloleat-Hydrolyse wies sogar nur 19% vom Wildtypenzym auf. Diese Verminderung der enzymatischen Aktivität war signifikant.

N45Q

Die zweite im Propeptid gelegene N-Glykosylierungsmutante der lysosomalen Lipase verlor gegen Triolein keinerlei Aktivität zum Wildtypenzym und lag zum Teil über den Werten, die das Wildtypenzym erreichte. Die Cholesteryloleat-Hydrolyse der Mutante erreichte eine Aktivität von 70%.

N74Q

Diese Mutante wies mit Aktivitätswerten gegen Triolein von 83% und Cholesteryloleat 62% ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zum Wildtypenzym auf.

N134Q und N246Q

Beide Mutanten hatten keinerlei Aktivität. N134 liegt in der Nähe des aktiven Zentrums der lysosomalen Lipase (S147); dies erklärt möglicherweise den Verlust der Aktivität dieser Mutante. Diese Daten zeigen, daß beide Glykosylierungsstellen in der lysosomalen Lipase tatsächlich glykosyliert sind. Sie sind offenbar für die Aktivität des Enzyms von großer Bedeutung.

N294Q

Die C-terminale N-Glykosylierungsstelle zeigte 72% Triolein-Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp; mit Cholesteryloleat eine Aktivität von 50%.

In **Abb. 16** sind die Daten zusammengefaßt.

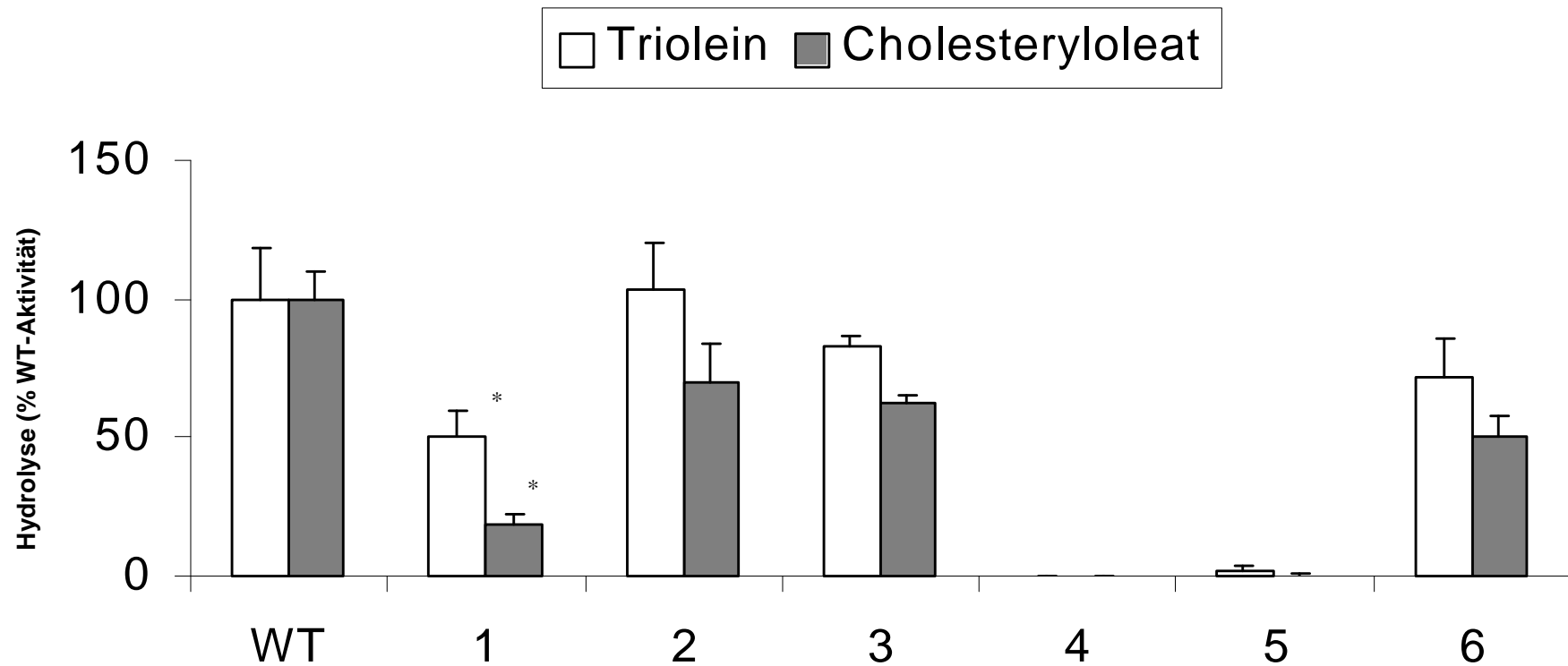


Abb. 16. Säulendiagramm zur lipolytischen Aktivität der N-Glykosylierungs-Einfachmutanten der lysosomalen Lipase.

WT: Wildtyp-(LAL-His); 1: N9Q; 2: N45Q; 3: N74Q; 4: N134Q; 5: N246Q; 6: N294Q. Es wurden die Substrate Cholesteryloleat und Triolein verwendet. Die Wildtypaktivität aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten wurde auf 100% gesetzt.

*: Die Werte für 1 (N9Q) waren gegen beide Substrate signifikant kleiner im Vergleich zum Wildtyp ($p(\text{Triolein})=0,02$; $p(\text{Cholesteryloleat})=0,01$).

Der Nachweis rekombinanter Lipasemutanten wurde mittels silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen und einer Western Blot-Analyse mit α -His₆-Antikörpern erbracht. Im Silbergel waren die Mutanten N134Q und N246Q nicht nachweisbar, was darauf schließen läßt, daß sie nicht sezerniert wurden, also nicht aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden konnten.

Die Proteinbande der Mutante N9Q schien eine etwas geringere Masse zu haben (**Abb. 17a**).

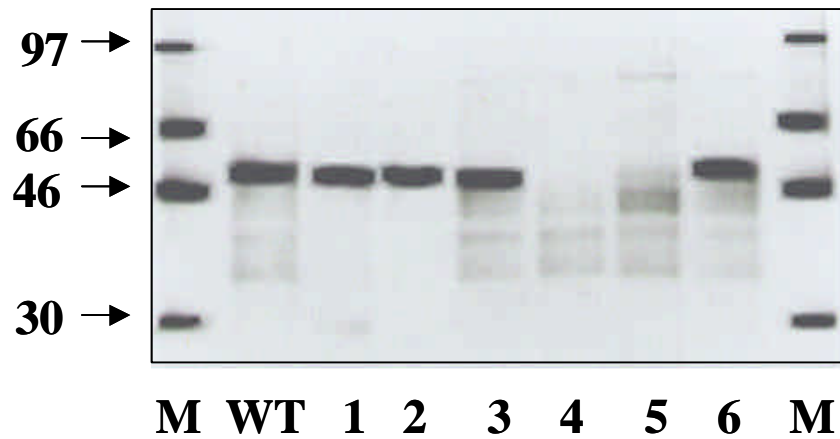
Die Western Blot-Analyse bestätigte die Ergebnisse des SDS-PAGE. So waren die Mutanten N134Q und N246Q, aufgereinigt aus dem Zellkulturüberstand, nicht immunologisch nachweisbar. Auch hier war die Masse von N9Q etwas geringer als die der anderen Mutanten (**Abb. 17b**).

N134Q und N246Q waren nach Aufreinigung aus dem Zellkulturexpressionsmedium der *Sf9*-Zellen weder im SDS-PAGE noch im Western Blot nachweisbar. Aktivitätsbestimmungen im Zellextrakt zeigten für diese beiden Mutanten keine Triolein-Hydrolyse (**Abb. 18**). Die anderen vier Einfachmutanten (N9Q, N45Q, N74Q und N294Q) wiesen Wildtyp-Aktivität auf.

Der Western Blot der Zellextrakte mit dem α -His₆-Antikörper zeigte bei allen Mutanten Degradationsprodukte. Diese waren bei der N9Q-Mutante am stärksten ausgeprägt. Erstaunlich dabei war die Detektion einer Bande oberhalb der 51 kDa-Bande der muren lysosomalen Lipase. Bei N134Q treten zwei schwache Banden auf, die unterhalb des muren Bereiches der lysosomalen Lipase liegen. Es konnte hier keine Enzymbande detektiert werden. N246Q zeigt eine schwache Bande an der Stelle, wo sich der Größe nach die lysosomale Lipase befinden sollte. Ferner zeigen sich schwache Banden geringen Molekulargewichts, die ebenfalls auf Degradationsprodukte schließen lassen (**Abb. 19**). Dieser Western Blot mit *Sf9*-Zellextrakten legt den Schluß nahe, daß die Mutanten N134Q und N246Q aufgrund fehlender Glykosylierung nicht gebildet beziehungsweise frühzeitig degradiert werden. Die Mutante N9Q scheint eine besondere Rolle zu spielen; möglicherweise ist N9 glykosyliert, jedoch für die Bildung eines (restaktiven) Enzyms nicht entscheidend. Zur detaillierten Untersuchung der Funktion von N9 wurden Doppelmutanten mit Ausnahme von N134Q und N246Q hergestellt.

a)

[kDa]



b)

[kDa]



Abb. 17. Silbergefärbtes SDS-PAGE (a) und Western Blot-Analyse (b) der N-Glykosylierungs-Einfachmutanten der lysosomalen Lipase.

Die Einfachmutanten wurden aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.

WT: Wildtyp (LAL-His); 1: N9Q; 2: N45Q; 3: N74Q; 4: N134Q; 5: N246Q; 6: N294Q.

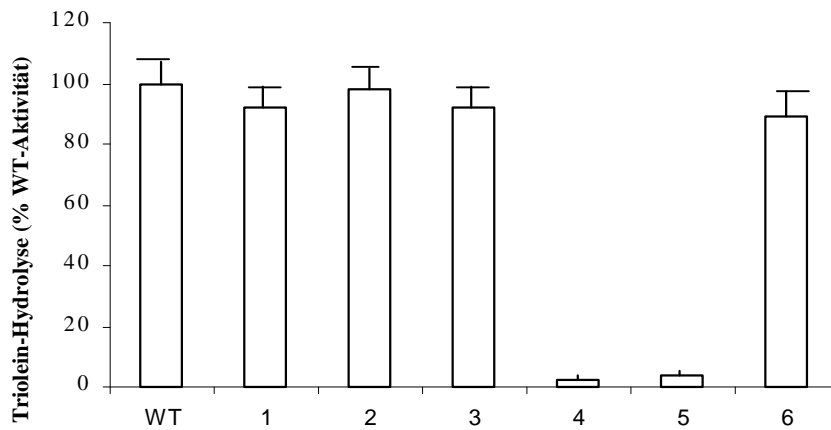


Abb. 18. Triolein-Hydrolyse der Zellextrakte der N-Glykosylierungs-Einfachmutanten.

WT: Wildtyp; 1: N9Q; 2: N45Q; 3: N74Q; 4: N134Q; 5: N246Q; 6: N294Q

[kDa]

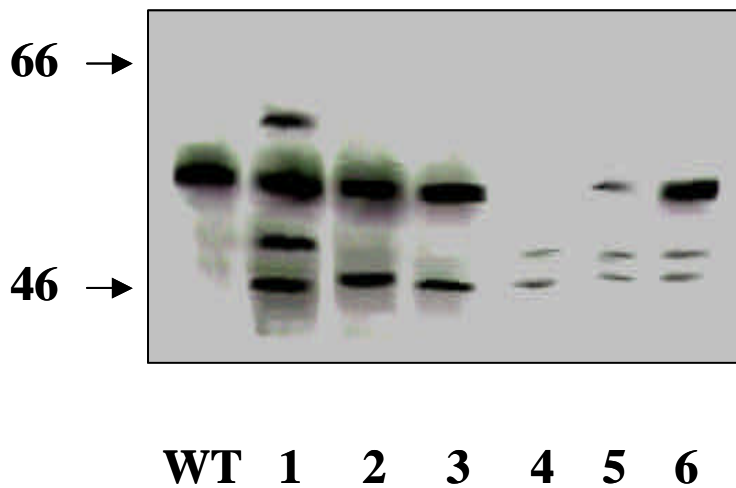


Abb. 19. Western-Blot-Analyse der N-Glykosylierungs-Einfachmutanten im Zellextrakt. Es wurde mit dem α -His₆-Antikörper detektiert.

WT: Wildtyp-(LAL-His); 1: N9Q; 2: N45Q; 3: N74Q; 4: N134Q; 5: N246Q; 6: N294Q

3.5.2. Doppelmutanten der N-Glykosylierungsstellen

Nach Identifizierung wurden die sich aus den möglichen Kombinationen ergebenden sechs Doppelmutanten der lysosomalen Lipase wie oben beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Ihre Aktivitäten wurden gegenüber ^3H -markiertem Triolein und ^{14}C -markiertem Cholesteryloleat gemessen. Dabei ergaben sich auch hier geringere Werte für Cholesteryloleat als für Triolein, bezogen auf 100% Wildtypenzymaktivität.

N9Q/N45Q, N9Q/N74Q und N9Q/N294Q

Diese drei Mutanten der Kombinationen mit der N9-Glykosylierungsstelle zeigten eine stark verminderte Aktivität sowohl gegenüber Triolein als auch gegenüber Cholesteryloleat (**Abb. 20**). So zeigten N9Q/N74Q und N9Q/N294Q nur 9% gegenüber Triolein und 13% bzw. 8% gegenüber Cholesteryloleat, wiesen also nur noch Restaktivitäten auf.

N45Q/N74Q

Diese Doppelmutante zeigte gegenüber Triolein 82% der Wildtypaktivität und gegenüber Cholesteryloleat 63% Aktivität. Daraus kann geschlossen werden, daß diese beiden Positionen keine wichtige Rolle in der N-Glykosylierung der lysosomalen Lipase spielen.

N45Q/N294Q

Gegenüber Triolein zeigte diese Mutante 58% Aktivität, jedoch gegen Cholesteryloleat nur noch 13%. Dies ist erstaunlich, weil damit nur noch eine Restaktivität gegen Cholesteryloleat bestimmt werden konnte, während N9Q als Einfachmutante noch Aktivitätswerte von 50% gezeigt hatte. Aufschluß sollte die zweite mögliche Kombination von N294Q, N74Q/N294Q, geben.

N74Q/N294Q

Diese Doppelmutante wies gegenüber Cholesteryloleat nur 46% der Aktivität auf, während sie die volle Trioleinhydrolyse zeigte. N294Q spielt diesen Daten zufolge eine Rolle für Bindung und Umsatz von Cholesteryloleat, nicht aber von Triolein. Die Daten zur lipolytischen Aktivität der Mutanten sind in **Abb. 20** dargestellt.

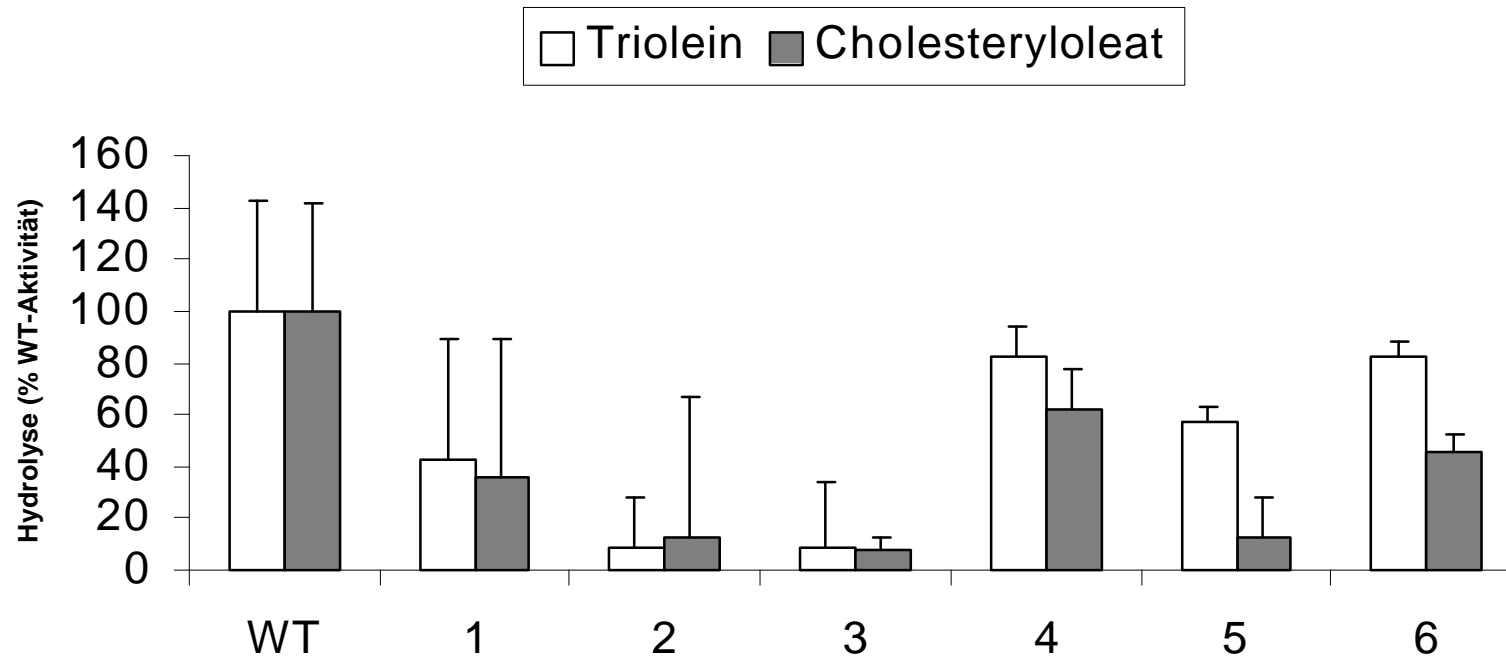
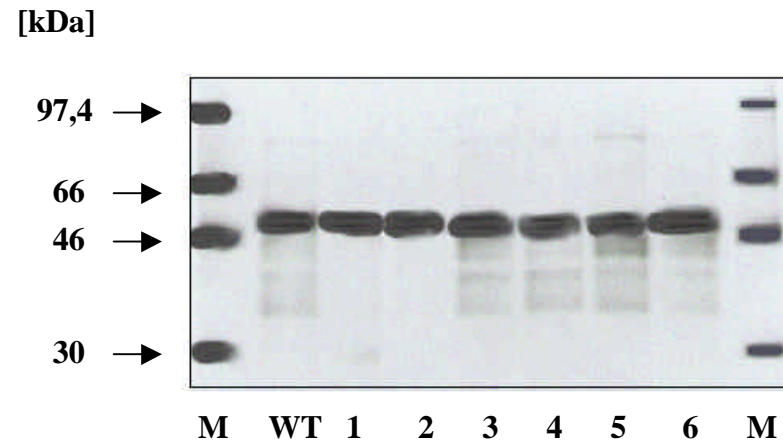


Abb. 20. Lipolytische Aktivität der N-Glykosylierungs-Doppelmutanten der lysosomalen Lipase.

WT: Wildtyp-(LAL-His); 1: N9Q/N45Q; 2: N9Q/N74Q; 3: N9Q/N294Q; 4: N45Q/N74Q; 5: N45Q/N294Q; 6: N74Q/N294Q. Es wurden die Substrate Cholesteryloleat und Triolein verwendet. Die Wildtypaktivität aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten wurde auf 100% gesetzt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

a)



b)

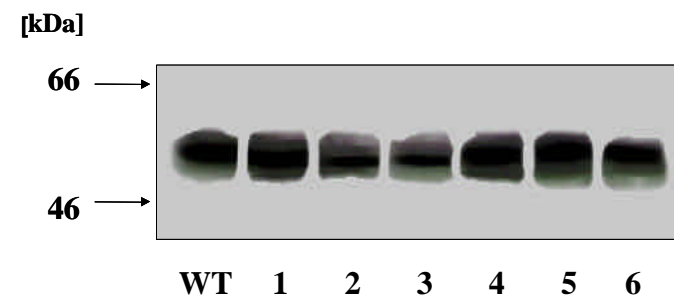


Abb. 21. Silbergefärbtes SDS-PAGE (a) und Western Blot-Analyse (b) der N-Glykosylierungs-Doppelmutanten der lysosomalen Lipase.
Die Doppelmutanten wurden aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.
WT: Wildtyp (LAL-His); 1: N9Q/N45Q; 2: N9Q/N74Q; 3: N9Q/N294Q; 4: N45Q/N74Q; 5: N45Q/N294Q; 6: N74Q/N294Q.

3. Ergebnisse

Die beschriebenen Doppelmutanten wurden in silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen und einer Western Blot-Analyse mittels eines α -His₆-Antikörpers charakterisiert. Im Silbergel konnten alle Proteine nachgewiesen werden (**Abb. 21a**). Es zeigten sich jedoch keine erkennbaren Größenunterschiede zwischen Doppelmutanten und Wildtyp der lysosomalen Lipase. Die Western Blot-Analyse bestätigte die Ergebnisse aus dem SDS-PAGE. Alle Doppelmutanten konnten immunologisch nachgewiesen werden, und auch hier zeigten sich keine erkennbaren Größenunterschiede (**Abb. 21b**).

Ziel der Arbeiten war es weiterhin, die Doppelmutanten der lysosomalen Lipase intrazellulär nachzuweisen. Dafür wurden Aktivitätsbestimmungen mit Triolein und ein Western Blot mit dem α -His₆-Antikörper durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmung der Doppelmutanten aus Zellextrakt ergab in den Verhältnissen zueinander keine Unterschiede verglichen mit den Werten der aufgereinigten Lipase-Mutanten aus dem Zellkulturüberstand. Die Doppelmutanten mit Kombinationen der N9-Glykosylierungsstellen zeigten deutlich geringere Werte für die Aktivität als die übrigen drei Doppelmutanten bzw. Wildtyp (**Abb. 22**). Im Western Blot aus Zellextrakten waren ebenfalls alle Doppelmutanten der lysosomalen Lipase detektierbar. Hier wurden keine Degradationsprodukte wie im Zellextrakt der Einfachmutanten nachgewiesen, was möglicherweise auf eine größere Homogenität der Proteine der Doppelmutanten schließen lässt (**Abb. 23**).

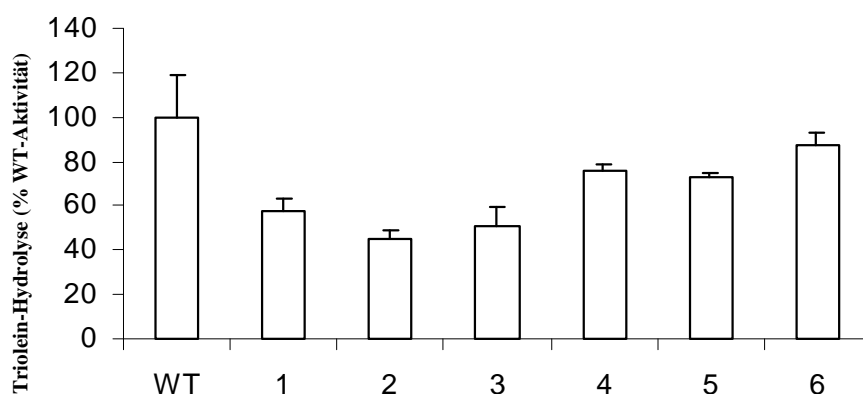


Abb. 22. Triolein-Hydrolyse der N-Glykosylierungs-Doppelmutanten im Zellextrakt.

WT: Wildtyp; 1: N9Q/N45Q; 2: N9Q/N74Q; 3: N9Q/N294Q; 4: N45Q/N74Q; 5: N45Q/N294Q; 6: N74Q/N294Q.

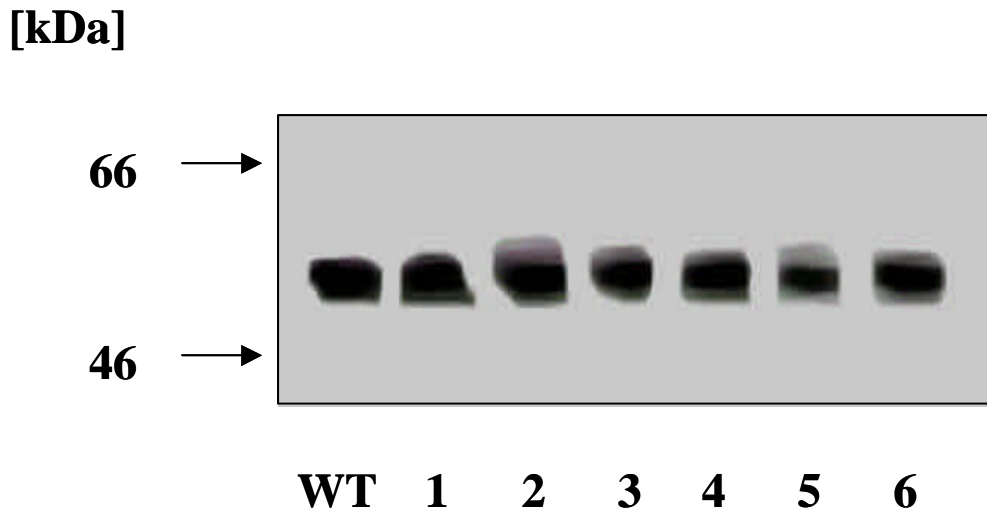


Abb. 23. Western-Blot-Analyse der N-Glykosylierungs-Doppelmutanten der lysosomalen Lipase mit dem α -His₆-Antikörper aus Zellextrakt.

WT: Wildtyp-(LAL-His); 1: N9Q/N45Q; 2: N9Q/N74Q; 3: N9Q/N294Q; 4: N45Q/N74Q; 5: N45Q/N294Q; 6: N74Q/N294Q.

3.5.3. Kinetik der N-Glykosylierungsmutanten

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten lysosomalen Lipase und ihrer Glykosylierungsmutanten wurden bei unterschiedlicher Substratkonzentration von Triolein und konstanter Enzymmenge (1 μ g) sowie durch Variation der Enzymmenge bei konstanter Substratmenge (250 μ M) untersucht. Für die lysosomale Lipase wurde die Michaelis-Menten-Kinetik angenommen. Mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) und die Michaelis-Konstanten (K_M) von Wildtypenzym und Mutanten bestimmt.

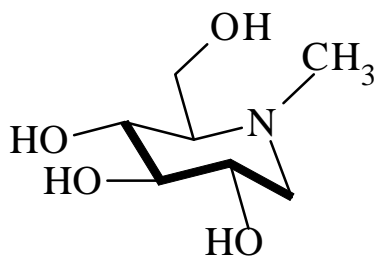
Der K_M -Wert für die rekombinante lysosomale Lipase beträgt 120 μ M und liegt damit im Bereich der aus Leber aufgereinigten lysosomalen Lipase (138 μ M; Dissertation M. Merkel, 1996). Die Michaelis-Konstanten sowohl der Einfach- (außer den nicht-gebildeten und somit nicht meßbaren Mutanten N134Q und N246Q) als auch der Doppelmutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Hieraus wird geschlossen, daß durch die Mutationen keine Veränderung in der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat verursacht wurden.

Die v_{\max} -Werte der N9Q-Mutante und ihrer Kombinationen zeigten deutlich geringere Werte im Vergleich zum v_{\max} des Wildtyps (230 nmol freie Fettsäure/min/ml). N9Q wies nur noch eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 90 nmol freie Fettsäure/min/ml

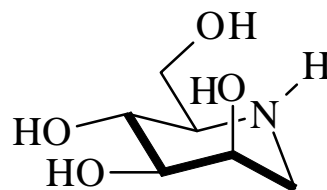
auf. N9Q/N45Q, N9Q/N74Q und N9Q/N294Q zeigten in derselben Reihenfolge folgende v_{\max} -Werte: 150, 50 und 25 nmol freie Fettsäure/min/ml. Die geringen v_{\max} -Werte, insbesondere von N9Q, N9Q/N74Q und N9Q/N294Q könnten für die verminderte enzymatische Aktivität dieser Glykosylierungsmutanten verantwortlich sein.

3.5.4. Inhibition der Glykosylierung mit N-Methyldeoxynojirimycin und 1-Deoxymannojirimycin

Im Verlauf der Expressionsexperimente mit Wildtyp-Lipase wurde dem T.C.100 1x-Medium zum einen 1 mM N-Methyldeoxynojirimycin und zum anderen 1 mM 1-Deoxymannojirimycin zugefügt. N-Methyldeoxynojirimycin interferiert mit dem Metabolismus von N-Glykoproteinen durch Inhibierung der Glucosidasen, verursacht somit ein Ausbleiben des Glucose-Trimming im RER. 1-Deoxymannojirimycin verhindert Mannose-Trimming im cis-Golgi-Kompartiment. Die Struktur dieser beiden Inhibitoren ist in **Abb. 24** wiedergegeben.



N-Methyldeoxynojirimycin



1-Deoxymannojirimycin

Abb. 24. Strukturformeln von N-Methyldeoxynojirimycin, dem Inhibitor des Glucose-Trimming im RER und 1-Deoxymannojirimycin, dem Inhibitor des Mannose-Trimming im cis-Golgi-Kompartiment.

Unterschiedliche lipolytische Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp sollten Aufschluß darüber geben, wo der entscheidende Schritt stattfindet, der zum Aktivitätsverlust der deglykosylierten lysosomalen Lipase führt. Es fanden sich jedoch im Zellextrakt keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität gegenüber ^3H -markiertem Triolein zwischen unbehandelter Wildtyp-Lipase und inhibierter lysosomaler Lipase (**Abb. 25**). Auch bei aus Zellkulturüberstand aufgereinigter lysosomaler Lipase zeigten sich keine

signifikanten Unterschiede zwischen inhibierter und nicht-inhibierter Expression (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, daß Glucose-Trimming in Insektenzellen für einen ungestörten Transport des Proteins vom RER zum Golgi-Apparat nicht nötig ist. Offensichtlich hat nur die Glykosylierung an sich, nicht aber das Trimming der Zuckerreste, Auswirkungen auf Transport und Aktivität der lysosomalen Lipase.

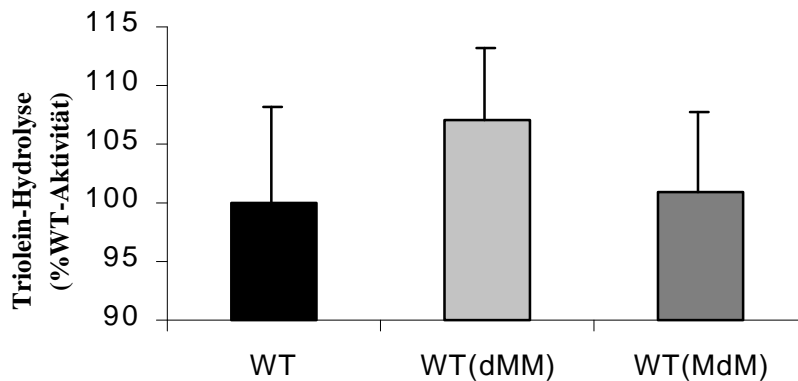


Abb. 25. Triolein-Hydrolyse von Wildtyp-Lipase im Zellextrakt mit und ohne 1-Deoxymannojirimycin (dMM) und N-Methyldeoxymannojirimycin (MdM). Es wurde jeweils 4 Tage exprimiert, im Falle der genannten Inhibitoren mit jeweils 1 mM der Substanzen im Zellkulturmedium.

3.6. Enzymatische Deglykosylierung der lysosomalen Lipase

Durch Inkubation der *in vitro* exprimierten Lipase mit O-Glykosidase, Neuraminidase und N-Glykosidase F (PNGase F) wurde das Ausmaß der Glykosylierung des Enzyms untersucht. N-Glykosidase F spaltet die N-Glykan-Bindung zwischen dem Asparagin der Polypeptidkette und dem ersten Mannoserest des Zuckermoleküls. Durch einen vollständigen Verdau der Lipase mit Glykosidase F kann theoretisch der gesamte Zuckeranteil an N-gebundenem Zucker vom Protein entfernt werden.

O-Glykosidase spaltet bei O-Glykanen das Disaccharid Gal $\beta(1-3)$ GalNAc ab, das als Core-Einheit an Serin oder Threonin gebunden vorkommt. Die Zucker dürfen allerdings nicht durch Sialinsäure substituiert sein, da sonst keine Spaltung stattfinden kann. Ist das der Fall, müssen die Substituenten zuerst chemisch oder enzymatisch (z.B. mit Neuraminidase) entfernt werden. Neuraminidase hydrolysiert terminale N- oder O-Acylneuraminsäure in Glykoproteinen, die $\alpha 2-3$, $\alpha 2-6$ oder $\alpha 2-8$ gebunden sind. Aus dem

genannten Grund wurden 0,2 µg lysosomaler Lipase mit O-Glykosidase immer gemeinsam mit Neuraminidase über Nacht bei 37°C verdaut. Es wurde auch ein Verdau mit allen genannten Enzymen in Kombination angesetzt. Wildtyp-Enzym ohne Enzymzusätze diente als Kontrolle. Es wurde unbehandelte lysosomale Lipase in Elutionspuffer bzw. in einer zweiten Reihe durch SDS, Nonidet P-40 und Hitze-denaturiertes Enzym eingesetzt. Da O-Glykosidase vom Hersteller mit BSA zur Stabilisation versetzt war, konnte die Silberfärbung einer SDS-PAGE nicht durchgeführt werden. Die Detektion durch einen Western Blot mit dem α -His₆-Antikörper war jedoch möglich (**Abb. 26**). Es zeigte sich, daß sowohl native als auch denaturierte lysosomale Lipase keine Verringerung der Masse durch Verdau mit O-Glykosidase/Neuraminidase erlangte, wobei eine genaue Massenbestimmung im Western Blot nicht möglich ist. N-Glykosidase F führte sowohl beim nativen als auch beim denaturierten Protein zu einer deutlichen Gewichtsreduktion, basierend auf der bereits gezeigten, ausgeprägten N-Glykosylierung an drei der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Die denaturierte Lipase zeigte nach N-Glykosidase F-Verdau noch eine zusätzliche Bande in Höhe der 45 kDa-Markerbande. Da die Bande im Bereich für die errechnete Masse der unglykosylierten lysosomalen Lipase (43,4 kDa) liegt, könnte dieses Protein neben einem Degradationsprodukt auch vollständig deglykosyliertes Enzym sein.

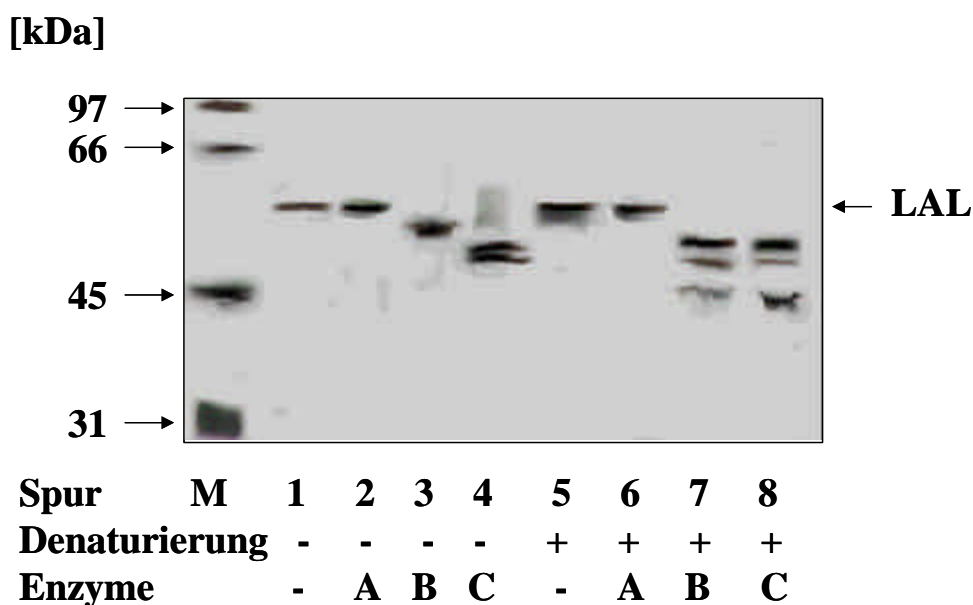


Abb. 26. Deglykosylierung nativer und denaturierter lysosomaler Lipase (LAL-His) im Western Blot. Es wurde durch O-Glykosidase/Neuraminidase (A), mit N-Glykosidase F (B) und den genannten Enzymen in Kombination (C) verdaut. Je Spur wurden 0,2 µg LAL-His geladen. Es wurde mit einem α -His₆-Antikörper detektiert.

3.7. Untersuchung der O-Glykosylierung

Es wurde eine mögliche O-Glykosylierungsstelle für die lysosomale Lipase beschrieben (T255). Da der unter 3.6. beschriebene Western Blot keine exakte Aussage zur möglichen O-Glykosylierung der lysosomalen Lipase erlaubte, wurde zur qualitativen Untersuchung der DIG Glykan Differentiation Kit (Roche) verwendet. Hierbei wurde Peanut agglutinin (PNA) verwendet. PNA erkennt das Core-Disaccharid Galaktose $\beta(1-3)$ N-acetylgalaktosamin und ist deshalb für die Erkennung von O-gebundenen Zuckerresten an Proteinen geeignet. Bei substituierten Disacchariden ist die Zugabe von Neuraminidase erforderlich, um die Substitutionsgruppe abzuspalten. Es wurden 0,2 μg Wildtyp-Lipase eingesetzt. Als Kontrollprotein wurde Asialofetuin verwendet. Die Detektion beruht auf der spezifischen Bindung von Lektinen an Carbohydrat-Resten, wobei das Lektin mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin konjugiert ist. Dies ermöglicht die immunologische Erkennung der gebundenen Lektine nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nitrozellulosemembrant. Nach mehrfacher Wiederholung des Versuchs gelang jedoch eine Detektion der rekombinanten lysosomalen Lipase (LAL-His) nicht (Daten nicht gezeigt). Damit muß angenommen werden, daß die lysosomale Lipase nicht O-glykosyliert ist.

Darüberhinaus wurde ein Baculovirus, der an der O-Glykosylierungsstelle T255 mutiert ist, hergestellt und untersucht. Dieser Baculovirusvektor exprimierte eine Form der lysosomalen Lipase, die eine T255V-Mutation aufwies. Die Mutation an der potentiellen O-Glykosylierungsstelle sollte die oben beschriebenen biochemischen Daten überprüfen, denenzufolge die lysosomale Lipase nicht O-glykosyliert ist. Erwartungsgemäß zeigte die Mutante nur einen geringen Unterschied (10-15%) in der Triolein-Hydrolyse aus aufgereinigten Zellkulturüberständen im Vergleich zum Wildtypenzym (Daten nicht gezeigt). Die etwas geringeren Werte der Aktivität der T255V-Mutante sind möglicherweise durch den Aminosäureaustausch selbst erklärbar, da die Aminosäure Valin im Vergleich zum ausgetauschten Threonin unpolar ist.

3.8. Mutationen an der vermuteten Prozessierungsstelle der lysosomalen Lipase

Mit der ursprünglich in der Arbeitsgruppe etablierten Aufreinigung lysosomaler Lipase aus humanem Lebergewebe wurden zwei Formen des Enzyms detektiert und analysiert. Eine Form zeigte eine Größe von etwa 41 kDa, die andere war etwa 55 kDa groß. N-terminale Sequenzierungen der zwei Formen ergaben, daß die mature Form der lysosomalen Lipase bei der 41 kDa-Form mit Gly50 und bei der 55 kDa-Form mit Ala1 beginnt. Es wurde dementsprechend postuliert, daß das Enzym eine posttranslationale Prozessierung unter Abspaltung eines 49 Aminosäuren umfassenden Propeptids erfährt.

Um diese mögliche Prozessierungsstelle zu untersuchen, wurden Mutationen an dieser Position erzeugt (s. **3.1.2.** und **Anhang II**), und das Enzym wurde im Baculovirussystem exprimiert. Nach Aufreinigung der Zellkulturüberstände mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie und Messungen der Triolein-Hydrolyse ergab sich folgendes:

G50A und die Mutante $\Delta 49$ der lysosomalen Lipase zeigten im Vergleich zum Wildtyp nur eine Restaktivität (G50A: 14%; $\Delta 49$: 4%). K49R zeigte dagegen nur eine geringfügig erniedrigte Triolein-Hydrolyse (im Mittel 86%) im Vergleich zum Wildtypenzym (**Abb. 27**). Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß das Propeptid zur Ausbildung eines aktiven Enzyms in Insektenzellen benötigt wird. Offensichtlich spielt dabei die Prozessierungsstelle eine besondere Rolle; dabei erscheint die Position ebenfalls von Bedeutung. G50 stellt offenbar eine wichtige Position dar.

Es wurde darüber hinaus ein Western Blot mit den Eluaten der Mutanten und dem Wildtypenzym aus einem Expressionsversuch durchgeführt (**Abb. 28**). Wildtypenzym (LAL-His) und die Mutante K49R konnten mit dem α -His₆-Antikörper detektiert werden, nicht aber G50A und $\Delta 49$. Offensichtlich werden diese Mutanten der lysosomalen Lipase nicht sezerniert.

3. Ergebnisse

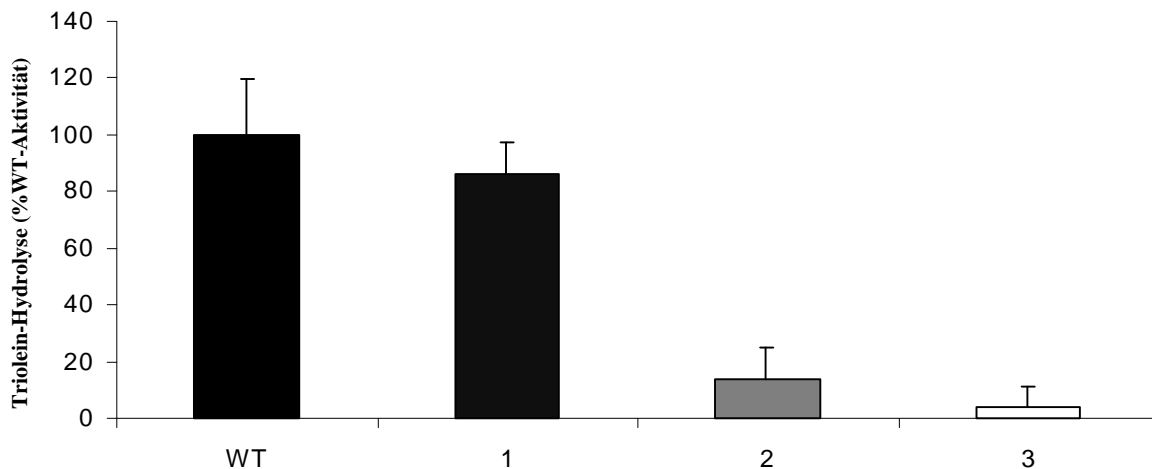


Abb. 27. Triolein-Hydrolyse der Mutanten des Propeptids der lysosomalen Lipase.

Es wurde das Substrat Triolein verwendet. Die Wildtypaktivität aus zwei unabhängigen Expressionsexperimenten wurde auf 100% gesetzt.

WT: Wildtyp-(LAL-His); 1: K49R; 2: G50A; 3: Δ 49 (Deletionsmutante).

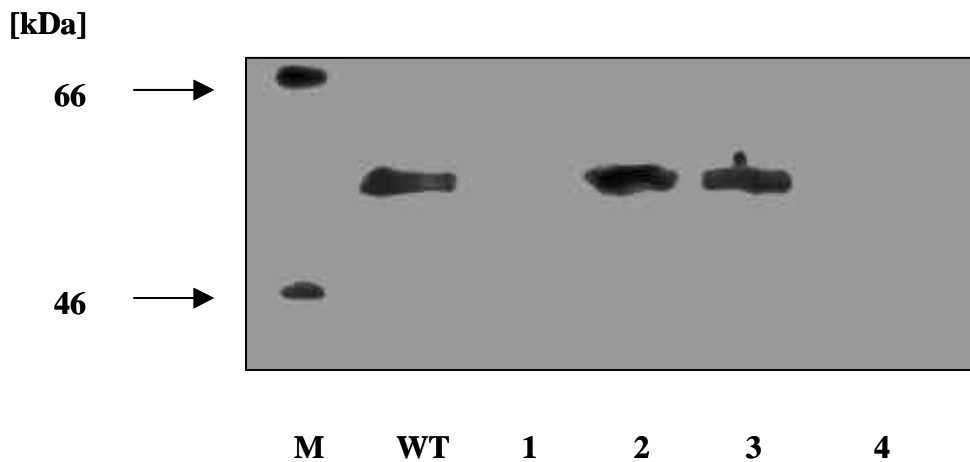


Abb. 28. Western Blot-Analyse der Prozessierungs- und O-Glykosylierungsmutanten der lysosomalen Lipase. Es wurden 500 ng Protein in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit dem α -His₆-Antikörper nachgewiesen.

WT: rekombinantes Wildtypenzym (LAL-His); 1: G50A; 2: T255V; 3: K49R; 4: Δ 49

3.9. Zugabe rekombinanter lysosomaler Lipase zu Fibroblastenkulturen von Wolman-Patienten

Ein Teil lysosomaler Enzyme wird von Zellen sezerniert und reinternalisiert. Ein Ziel der rekombinanten Herstellung lysosomaler Lipase aus Insektenzellen war die Untersuchung der Internalisierung und seiner Auswirkungen der verschiedenen Formen des Enzyms in kultivierten Zellen, die eine Defizienz der endogenen lysosomalen Lipase aufweisen. Hierzu wurden K362-Fibroblasten eines Patienten mit Wolman'scher Erkrankung, die defizient für die lysosomale Lipase sind, kultiviert und mit jeweils 150 µg rekombinanter lysosomaler Lipase für eine bzw. 2,5 h inkubiert. Für einen Vorversuch wurde Wildtypenzym verwendet; nach der beschriebenen Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Triolein-Hydrolyse von behandelten und unbehandelten K362-Zellen gemessen.

Es zeigte sich kein Unterschied der intrazellulären Triolein-Aktivität von behandelten und unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies läßt darauf schließen, daß die aus *Sf9*-Zellen gewonnene lysosomale Lipase nicht von den Fibroblasten aufgenommen wird. Die Reinternalisierung kann somit mit rekombinanter *Sf9*-Zell-Lipase nicht untersucht werden. Hierfür könnte eine im Vergleich zu humanen Zellen unterschiedliche Glykosylierung der *Sf9*-Zell-Lipase verantwortlich sein.

4. Diskussion

Die lysosomale Lipase gilt als Schlüsselenzym im lysosomalen Abbau von Triglyzeriden und Cholesterolestern; sie stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen intra- und extrazellulärem Fettstoffwechsel dar. Verschiedene Reinigungsversuche der lysosomalen Lipase, z. B. aus Aorta (Sakurada *et al.*, 1976), Plazenta (Burton u. Mueller, 1980), Fibroblasten (Sando u. Rosenbaum, 1985) und humaner Leber (Warner *et al.*, 1981; Ameis *et al.*, 1994; Merkel *et al.*, 1999) wurden unternommen. Detaillierte Studien zur Struktur und Funktion der Lipase waren jedoch aufgrund der geringen Konzentration in den untersuchten Geweben und der Instabilität des Enzyms nicht möglich. Dies gelang erst durch heterologe Expression einer modifizierten Lipase im Insektenzellen-/Baculovirussystem (Tilkorn *et al.*, 1999).

Ergebnisse zur Struktur und Funktion der lysosomalen Lipase, die bei diesen Arbeiten gewonnen wurden, werden im ersten Teil der Diskussion beschrieben. Dabei wird auf die Verifizierung der lysosomalen Lipase für das Baculovirus-Expressionssystem eingegangen. Anschließend werden Ergebnisse zur Expression von Mutanten potentieller Glykosylierungsstellen der lysosomalen Lipase, die durch zielgerichtete Mutagenese gewonnen wurden, diskutiert. Ferner geben erste Ergebnisse von Mutanten des Propeptids bzw. der Schnittstelle zwischen Propeptid und maturem Enzym Grund für weitere Untersuchungen zur proteolytischen Prozessierung der lysosomalen Lipase. Abschließend werden Mutationen und deren lipolytischen Aktivitäten in Zusammenhang mit den Krankheitsbildern gebracht, die bei Defizienzen der lysosomalen Lipase auftreten.

4.1. Aufbau und Struktur der im Baculovirussystem exprimierten lysosomalen Lipase

Viele Transmembranproteine oder sekretorische Proteine werden mit einem N-terminalen Signalpeptid von 13 bis 36 vorwiegend hydrophoben Resten synthetisiert. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Signalpeptide zeigen nur geringe signifikante Übereinstimmungen; es wurden drei Hauptmerkmale aufgedeckt: (1) Die Signalsequenz weist eine positive Ladung am aminoterminalen Ende auf. (2) Sie hat einen hydrophoben

Kern. (3) Der Carboxyterminus der Signalsequenz ist polar (von Heijne, 1990). Die von Blobel formulierte Signalthypothese beschreibt die Bindung des Signalpeptids an ein Signal-Erkennungspartikel (SRP) (Lingappa u. Blobel, 1980). Das SRP bindet ein Signalpeptid-synthetisierendes Ribosom an einen membranständigen Rezeptor des RER und führt das Signalpeptid und das folgende, naszierende Polypeptid durch die Membran hindurch. Proteine mit einem Signalpeptid werden als Präproteine bezeichnet. Falls sie zusätzlich ein Propeptid, das die korrekte Faltung eines Proteins organisiert und für die Sekretion wichtig ist, enthalten (Conner, 1992), werden sie als Präproproteine bezeichnet. Sobald das Signalpeptid die Membran passiert hat, wird es von einer Signalpeptidase spezifisch vom naszierenden Polypeptid getrennt. Derartige und andere Proteine erfahren nacheinander drei proteolytische Spaltungen: (1) Deletion des Initiations-Methionins, (2) Entfernung des Signalpeptids und (3) Exzision des Propeptids. Die lysosomale Lipase weist ein Signalpeptid mit 27 Aminosäuren auf, dem sich ein vermutetes Propeptid mit 49 Aminosäuren anschließt. Weitere Beispiele lysosomaler Hydrolasen als Präproproteine sind α -Fukosidase (Johnson *et al.*, 1991) und Cathepsin D (Richo u. Conner, 1994).

Die Herstellung großer Mengen biologisch aktiver Proteine in baculovirusinfizierten Insektenzellen wurde häufig dadurch verhindert, daß heterologe Proteine entweder im Zytoplasma in unlöslicher Form vorlagen oder einer unspezifischen Proteolyse unterlagen. Durch die Auswahl geeigneter Signalpeptide konnte dieses Problem für einige Proteine umgangen werden. Als geeignet erwiesen sich die Präsequenzen der alkalischen Plazenta-Phosphatase (Millán, 1986). Zur heterologen Expression der lysosomalen Lipase in Insektenzellen wurde daher in unserer Arbeitsgruppe dieses Signalpeptid anstelle des nativen Lipase-Propeptids vor die cDNA der lysosomalen Lipase kloniert.

Der C-Terminus der lysosomalen Lipase wurde ebenfalls modifiziert, um eine Aufreinigung der rekombinanten lysosomalen Lipase und ihrer Mutanten aus dem Zellkulturüberstand der *Sf9*-Insektenzellen mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Voraussetzung war die korrekte Klonierung eines DNA-Sequenzstückes, das für sechs Histidin-Reste am C-Terminus kodiert.

Aufgrund der Kenntnis, daß zwischen den beiden Cysteinen C221 und C231 der lysosomalen Lipase eine Disulfidbrücke gebildet wird (Lohse *et al.*, 1997b) und aus Daten zur Homologie und Identität mit der humanen gastrischen Lipase, von der eine Röntgenstrukturanalyse vorliegt (Canaan *et al.*, 1999), wurde ein dreidimensionales

Modell der lysosomalen Lipase konstruiert (vgl. **Abb. 3**). Die katalytische Triade umfaßt die Aminosäurereste S147, H353 und D324.

Da mit Beginn der hier beschriebenen Arbeiten keine Daten über die Glykosylierung und proteolytischen Prozessierung der lysosomalen Lipase vorlagen, war es Ziel dieser Doktorarbeit, beide Domänen des Enzyms genauer zu untersuchen.

4.2. Glykosylierung der lysosomalen Lipase

Die Primärsequenz der lysosomalen Lipase enthält sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, identifizierbar durch die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann (Gavel u. von Heijne, 1990). Weitere Daten zur Aminosäurepräferenz gibt es von Mellquist *et al.*, die Glykosylierungsmutanten des Rabiesvirus-Glykoproteins untersuchten (Mellquist *et al.*, 1998). So fanden sie heraus, daß W an Position X bzw. der Konsensussequenz folgend und Cysteinreste in Position X die Glykosylierung unterbanden. Es wird beschrieben, daß W die Glykosylierung aufgrund seiner voluminösen Seitenkette verhindert, während Cysteine Disulfidbrücken ausbilden können. In der Sequenz der lysosomalen Lipase sind jedoch bei allen sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen weder W noch C an Position X der Konsensussequenzen oder diesen folgend zu finden, so daß diese beschriebenen Phänomene bei der lysosomalen Lipase keine Rolle spielen. Andere Autoren zeigten, daß beim Rabiesvirus-Glykoprotein Asn-X-Thr effizienter glykosyliert als Asn-X-Ser. So wurden 92% der neu synthetisierten Asn-X-Thr-Sequenzen glykosyliert und 57% der Asn-X-Ser-Sequenzen (Kasturi *et al.*, 1995). Asn-X-Thr tritt jedoch lediglich bei N134 der lysosomalen Lipase auf (Asn¹³⁴-Lys-Thr). Welche der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in der lysosomalen Lipase genutzt werden, ist bisher nicht bekannt. Anhand der SDS-PAGE-Analyse ließ sich ein Zuckeranteil von 13,5 kDa (24%) für die aus humanem Lebergewebe gewonnene Lipase abschätzen (Ameis *et al.*, 1994). An diesem Zuckeranteil könnte auch eine O-Glykosylierung der lysosomalen Lipase beteiligt sein. Potentiell wird T255 der lysosomalen Lipase an seiner OH-Gruppe glykosyliert (Gupta *et al.*, 1999). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie man die Glykosylierung bei Proteinen untersuchen kann: (1) durch Entfernung von Oligosaccharid-Seitenketten durch Endoglykosidasen; (2) durch Einsatz von Inhibitoren der Glykoprotein-Biosynthese oder (3) durch zielgerichtete Mutagenese potentieller Glykosylierungsstellen.

4.2.1. Chemische Untersuchungen

Durch einen Verdau rekombinant im Baculovirussystem exprimierter lysosomaler Lipase mit N-Glykosidase F war die Deglykosylierung trotz der langen Reaktionszeit und der großen Menge an Glykanase nicht vollständig. Nach Denaturierung der lysosomalen Lipase durch Hitze, SDS und Nonidet P-40 und anschließender Reaktion unter denselben Bedingungen verlor das Enzym ca. 5 kDa mehr an Masse. Damit wies das Enzym eine Masse von etwa 45 kDa auf und lag somit in der Nähe der für das unglykosylierte Polypeptid errechneten Masse von 43,4 kDa.

Ein Verdau der rekombinanten Wildtyp-Lipase mit O-Glykosidase/Neuraminidase ergab weder bei der nativen noch bei der denaturierten Form des Enzyms eine erkennbare Reduzierung der Proteinmasse im SDS-PAGE. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde Wildtypenzym nochmals mit O-Glykosidase/Neuraminidase über Nacht verdaut und anschließend mit Peanut agglutinin inkubiert. Peanut agglutinin erkennt typische Core-Oligosaccharide an O-Glykosylierungsstellen. Der Test mit lysosomaler Lipase war negativ. Folglich ist die lysosomale Lipase nicht O-glykosyliert. Zur Kontrolle dieser Daten wurde ein Baculovirus produziert, der in Position T255 mutiert wurde.

In diesem Zusammenhang ist wichtig, daß die Glykosylierung der im Insektenzellsystem exprimierten lysosomalen Lipase von der aus humanem Lebergewebe gewonnenen Lipase differiert. Es gilt zwar als gesichert, daß N- und O-Glykosylierung in Insektenzellen wie in humanen Zellen stattfindet (Fraser, 1992; Altmann *et al.*, 1999; Geisse u. Kocher, 1999). Eine Analyse der Zucker von rekombinantem Hemagglutinin ergab jedoch, daß den Insektenzellen zumindest die Transferasen für Sialinsäure und Galaktose fehlen (Kuroda *et al.*, 1990). Nach Übertragung des Core-Oligosaccharides können Mannose-Reste getrimmt und einige Fukosereste angehängt, jedoch keine komplexen Zucker gebildet werden. Dies erklärt die geringere Masse der rekombinanten lysosomalen Lipase im Vergleich zur Leberlipase. Es konnte außerdem aus Untersuchungen zur Glykosylierung rekombinanten Prorenins in Insektenzellen gezeigt werden, daß *Sf9*-Zellen das Mannose-6-Phosphat Erkennungssignal fehlt (Aeed u. Elhammer, 1994). Für lysosomale Enzyme ist dieser Transportweg jedoch wichtig. So wurde kürzlich das Trafficking lysosomaler Enzyme in Mäusen untersucht, die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-defizient sind (Dittmer *et al.*, 1999). Die Analyse ergab, daß der Transport lysosomaler Enzyme auf drei Wegen erfolgen kann: (1) intrazellulär vom ER zum Lysosom über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren; (2) via Zell-Zell-Kontakt und (3)

über Sekretion/Reinternalisierung durch Endozytose via Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren. Dabei war die Art des Transports zelltypspezifisch. So erfolgen das Cathepsin D-Targeting und das anderer lysosomaler Enzyme in Hepatozyten Mannose-6-Phosphat-Rezeptor unabhängig, nicht aber in Mausfibroblasten.

Daß eine Reinternalisierung lysosomaler Enzyme in Fibroblastenzellen grundsätzlich möglich ist, zeigten Sando und Neufeld bereits 1977. Sie verwendeten aus menschlichem Urin isolierte α -L-Iduronidase. Die Autoren fanden heraus, daß die Aufnahme des Enzyms über phosphorylierte Zuckerreste des Enzyms, die an Rezeptoren der Zelloberfläche binden, stattfindet (Sando u. Neufeld, 1977). Nach Zugabe von rekombinanter lysosomaler Lipase zu Fibroblasten mit einer Defizienz der lysosomalen Lipase konnte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten keine intrazelluläre Triolein-Hydrolyse detektiert werden. Dies unterstützt die Aussage, derzufolge in Insektenzellen keine Phosphorylierung der N-Glykane stattfindet, so daß eine Reinternalisierung des Enzyms in die Zelle unmöglich wird. Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen einer N-Acetylglucosamin-phosphotransferase der *Sf9*-Zellen zurückzuführen. Die fehlende Phosphorylierung an Zuckerresten von Wildtypenzym und Mutanten der lysosomalen Lipase, die im Baculovirussystem exprimiert wurden, macht die Untersuchung des Weges und der Sortierung dieses Enzyms in LAL-defizienten Fibroblasten unmöglich.

Zur Untersuchung der Funktion der Zuckerreste der rekombinanten lysosomalen Lipase wurden Experimente mit dem Antibiotikum Tunicamycin durchgeführt (Sheriff *et al.*, 1995). Tunicamycin hemmt die Übertragung des N-Acetylglucosamins auf den Dolicholphosphat-Carrier und blockiert somit den ersten Schritt der Bildung des Core-Oligosaccharids. Die deglykosylierte Form des Enzyms, die von Sheriff und Mitarbeitern ebenfalls in Insektenzellen exprimiert wurde, zeigte keine lipolytische Aktivität. Hieraus schlossen die Autoren, daß die cotranslationale Glykosylierung für die Bildung eines katalytisch aktiven Konformers benötigt wird. Die Daten von Sheriff *et al.* und die hier beschriebenen Daten zeigen, daß die Glykosylierung für die korrekte Bildung von Disulfidbrücken und/oder für die Faltung unerlässlich ist.

Ein bekannter Transportmechanismus sekretorischer und lysosomaler Proteine vom ER zum Zielort ist der vesikuläre Transport. Es schnüren sich Vesikel vom ER ab, die zum cis-Golgi-Kompartiment diffundieren und hier mit der Membran einer Zisterne fusionieren. Diese Vesikel enthalten Rezeptoren, die Zuckermoleküle auf der Oberfläche der zu transportierenden Proteine erkennen. Durch die Ausstattung der Vesikel mit einer Vielzahl von Rezeptoren wird ein gerichteter Transport ermöglicht. Fehlen die Zucker

auf einem naszierenden Protein, kann es unter Umständen nicht korrekt sortiert werden. Das Protein wird dann im ER oder Golgi zurückgehalten. Dieses Phänomen ist für eine Reihe von Proteinen beschrieben worden. Die Tunicamycin-Behandlung einer mit dem Vaccinia-Virus exprimierten Vorform des Nervenwachstumsfaktors (proNGF) zeigte, daß die N-Glykosylierung für den Austritt von proNGF aus dem ER und seine Prozessierung zum NGF essentiell ist. Das Schicksal der unglykosylierten Form des proNGF konnte nicht geklärt werden; wahrscheinlich wird es durch proteolytische Enzyme abgebaut (Seidah *et al.*, 1996). Grinnell *et al.* demonstrierten, daß die Tunicamycin-Behandlung von 293 Zellen, die humanes Protein C sezernieren, zu einer 5-10fach verringerten Sekretion führte. Daraus schlossen die Autoren, daß die Anwesenheit von Oligosaccharidseitenketten an strategischen Positionen im Polypeptid für eine korrekte Faltung und einen effizienten intrazellulären Transport essentiell sind (Grinnell *et al.*, 1991). N-Acetylglucosaminyltransferase III ist ein Glycoprotein, das selbst in der Biosynthese von N-gebundenen Oligosacchariden involviert ist. Tunicamycin-Behandlung bei der Expression der N-Acetylglucosaminyltransferase III in COS-1-Zellen führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Es wurde ferner gezeigt, daß das Enzym seine N-Glykosylierung benötigt, um seine Funktion und seinen Verbleib im Golgi-Apparat wahrzunehmen (Nagai *et al.*, 1997).

Die Baculovirusexpression einer Lutropin-Rezeptor-Domäne zeigte die Notwendigkeit einer minimalen N-Glykosylierung, damit es zur korrekten Faltung des Proteins kommt. Ohne N-Glykosylierung, wie sie nach Inkubation mit Tunicamycin auftrat, wurde die Lutropin-Rezeptor-Domäne nicht sezerniert und zeigte keine adäquate Ligandenbindung; dies war trotz vorhandener O-Glykosylierung zu beobachten (Pajot-Augy *et al.*, 1999).

Die Rolle der Glykosylierung ist auch bei lysosomalen Proteinen eingehend untersucht worden. Humanes Procathepsin D, bei dem die N-Glykosylierung durch Tunicamycin verhindert wurde, konnte bei einer Expression in Säugerzellen (CHO L-76-Zellen) nur in sehr geringen Maße zu den Lysosomen transportiert werden (Fortenberry *et al.*, 1995). Die Glykosylierungsmutante N43 der humanen Lipoproteinlipase wird aufgrund defizienter Glykosylierung im ER zurückgehalten und dementsprechend nicht sezerniert. Dies wurde durch Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigt (Busca *et al.*, 1995). Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Lokalisierung der lysosomalen Lipase in Zellkompartimenten sind in Insektenzellen aufgrund der geringen Größe dieser Zellen nicht möglich. Um Aussagen über den Transport und das Zucker-Trimming zu erhalten, wurden den Wildtyp-Lipase exprimierenden Insektenzellen in zwei unabhängigen

Versuchen N-Methyldeoxynojirimycin oder 1-Deoxymannojirimycin hinzugegeben. N-Methyldeoxynojirimycin inhibiert Glucosidasen und verhindert so das Glucose-Trimming im RER. 1-Deoxymannojirimycin verhindert das Mannose-Trimming im cis-Golgi-Kompartiment. Die Aktivitätsmessungen der exprimierten lysosomalen Lipase zeigten weder im Zellextrakt noch im Zellkulturüberstand signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Folglich ist Glucose-Trimming in Insektenzellen für einen ungestörten Transport des Enzyms vom RER zum Golgi-Kompartiment nicht erforderlich. Offensichtlich hat nur der Umfang der Glykosylierung an sich, nicht aber das Trimming der Zuckerreste Auswirkungen auf Transport und Aktivität der lysosomalen Lipase.

Verhoeven *et al.* zeigten für die humane hepatische Lipase hierzu divergente Daten. HepG2-Zellen wurden kultiviert und mit Tunicamycin (10 µg/ml), 1-Deoxymannojirimycin und N-Methyldeoxynojirimycin (jeweils 1 mM) behandelt. Aus intrazellulären Messungen der Aktivität der humanen hepatischen Lipase wurde nach dieser Behandlung eine Inhibition der Sekretion der humanen hepatischen Lipase nach Inkubation mit Tunicamycin und N-Methyldeoxynojirimycin, nicht aber für 1-Deoxymannojirimycin festgestellt. Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß die Prozessierung der Oligosaccharide durch Glucosidasen im ER für den Transport neusynthetisierter humaner hepatischer Lipase ins Golgi-Kompartiment unentbehrlich ist. Wahrscheinlich verhindert die Präsenz terminaler Glukose-Reste bei N-Methyldeoxynojirimycin-behandelten HepG2-Zellen den Austritt aus dem RER, so daß das Protein nicht in seine korrekte dreidimensionale Struktur überführt werden kann. Gleiches wird durch den vollständigen Verlust der Glykosylierung nach Behandlung mit Tunicamycin postuliert (Verhoeven *et al.*, 1999).

4.2.2. Zielgerichtete Mutagenese der Glykosylierungsstellen der lysosomalen Lipase

Neben einer biochemischen Untersuchung der N-Glykosylierung von Proteinen findet die zielgerichtete Mutagenese Anwendung. Diese besteht darin, Asparaginreste der N-Glykosylierungsstellen und das Threonin der O-Glykosylierungsstelle in andere Aminosäuren auszutauschen, die nicht in der Lage ist, Zuckerreste zu binden. In der Literatur lassen sich für diese Strategie zahlreiche Beispiele finden.

Rekombinantes humanes von Willebrand Faktor Reporter Protein (rHVF) wies eine O-Glykosylierungsstelle auf. Nach zielgerichteter Mutagenese des verantwortlichen Threoninrestes zu Glyzin und Expression in Cos7-Zellen verringerte sich die Masse im Vergleich zum Wildtypenzym deutlich. Untersuchungen zur Funktion des rHVF wurden nicht durchgeführt (Nehrke *et al.*, 1996). Die O-Glykosylierung einer synthetischen Variante des humanen chorionischen Gonadotropins, einem Mitglied der Glycoprotein-Hormone, wurde durch multiple zielgerichtete Mutagenese nachgewiesen (Sugahara *et al.*, 1996). In Carboxypeptidase Y wurden die vier N-Glykosylierungsstellen mutagenisiert. Dabei wurden Asparaginreste in Alanin ausgetauscht. Die Autoren fanden bei Expression in Hefezellen keinen Unterschied in der Menge mutierten Enzyms im Vergleich zum Wildtyp. Hieraus schlossen sie, daß die Zuckerreste bei Carboxypeptidase Y keine Rolle für eine korrekte Faltung und Sekretion spielen (Shimizu *et al.*, 1999). Die humane Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) wies ebenfalls vier N-Glykosylierungsstellen auf. Nach zielgerichteter Mutagenese der Asparaginreste zu Threonin zeigte sich nur eine Position als essentiell für die intrazelluläre Prozessierung. Eine weitere Position resultierte in einer deutlichen Verringerung der Enzymaktivität. Die Expression erfolgte in COS-6-Zellen (Qu *et al.*, 1993). Die humane saure Sphingomyelinase, die im Lysosomen lokalisiert ist und bei Aktivitätsverlust zur lysosomalen Akkumulation von Sphingomyelin führt, besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen. Jede N-Glykosylierungsstelle wurde mutagenisiert; dabei wurden Asparaginreste zu Glutamin mutagenisiert. Nach Expression in COS-1-Zellen führte der Verlust einer Glykosylierungsstelle (Position $\Delta G5$) sowohl im Überstand als auch im Zellextrakt zu einem enzymatisch inaktiven Enzym, das im ER und Golgi akkumulierte (Ferlinz *et al.*, 1997). Bei der humanen gastrischen Lipase wurden die vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen mittels zielgerichteter Mutagenese untersucht (Wicker-Planquardt *et al.*, 1999). Dieses Enzym ist für die hier beschriebenen Arbeiten von besonderer Bedeutung, da es eine ausgeprägte Homologie zur lysosomalen Lipase aufweist. So zeigt die lysosomale Lipase mit der humanen gastrischen Lipase 58% Identität und 75% Homologie. Dies resultiert aus einer hoch-konservierten Genstruktur (Lohse *et al.*, 1997a). Der humanen gastrischen Lipase fehlt jedoch die Cholesterolesterhydrolase-Aktivität, und sie besitzt nur vier potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die Positionen N15, N80, N252 und N308 der humanen gastrischen Lipase wurden einzeln zu Alanin mutagenisiert und die Mutanten in Insektenzellen exprimiert. Bei diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß der Verlust der Glykosylierungsstellen N15, N80 und N252

keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Der Verlust der Glykosylierungsstelle N308 reduzierte hingegen die Enzymaktivität um 50%. Gleichzeitige zielgerichtete Mutagenese aller potentiellen N-Glykosylierungsstellen führte zu einer deutlichen Verringerung von Biosynthese und Sekretion (Wicker-Planquardt *et al.*, 1999).

Die Auswahl der mutanten Aminosäure muß sorgfältig durchdacht sein, da der Austausch von Aminosäuren eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins bewirken und somit zu einer Veränderung der Eigenschaften des Proteins führen kann. Für die zielgerichtete Mutagenese der O-Glykosylierungsstelle der lysosomalen Lipase erschien der Austausch von Threonin zu Valin als am besten geeignet, auch wenn Valin nicht polar ist. Valin ist Threonin strukturell am ähnlichsten. Für die N-Glykosylierungsstelle ist ein Austausch von Asparagin zu Glutamin am besten geeignet, da Glutamin Asparagin chemisch sehr ähnlich ist. Die Strukturformeln der genannten Aminosäuren sind in **Abb. 29** dargestellt.

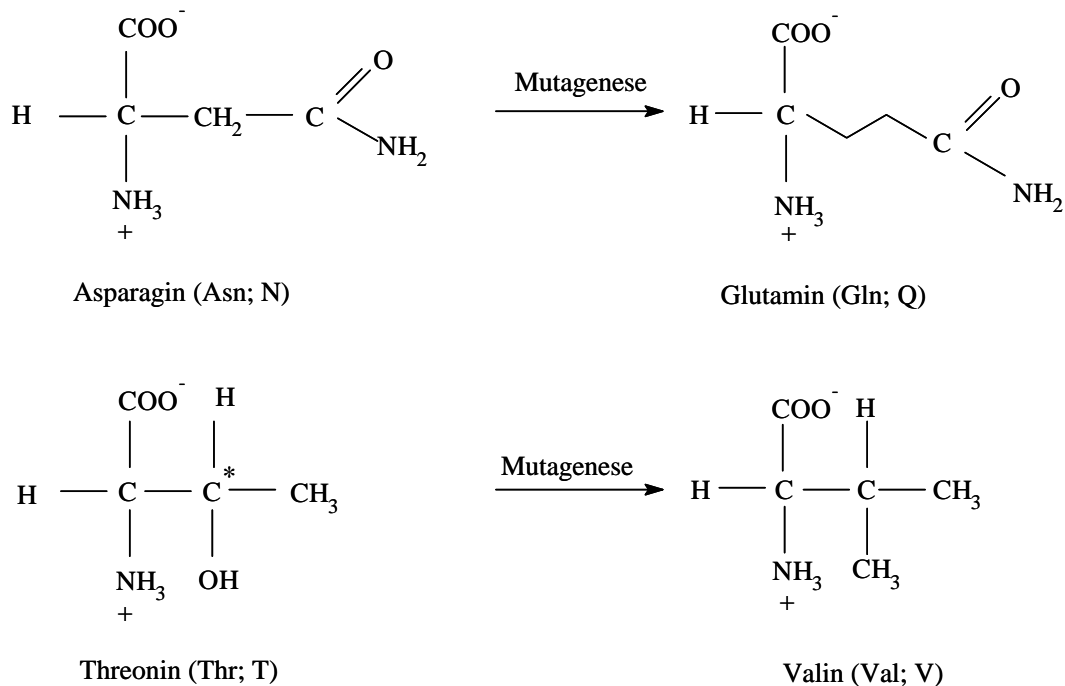


Abb. 29. Strukturformeln der ausgetauschten Aminosäuren an den Glykosylierungsstellen. Die Richtung des Austausches wird durch den Pfeil angezeigt. Asparagin und Glutamin sind beides Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten. Threonin hat im Gegensatz zum Valin eine ungeladene aber polare Seitenkette. Threonin ist außerdem eine Aminosäure mit chiralem Zentrum, dargestellt durch den Stern am Kohlenstoffatom.

Wie oben beschrieben, war es mit chemischen Untersuchungsmethoden nicht möglich, eine O-Glykosylierung der lysosomalen Lipase festzustellen. Zur Überprüfung dieser Daten wurde eine T255V-Mutante der lysosomalen Lipase hergestellt (siehe **Abb. 29**) und in Insektenzellen exprimiert. Bei fehlender O-Glykosylierung des Wildtypenzym sollte die exprimierte O-Glykosylierungsmutante eine Aktivität zeigen, die in etwa dem Wildtypenzym entspricht. Dies war auch nachweisbar. Es kann somit festgehalten werden, daß die lysosomale Lipase nicht O-glykosyliert ist. Dies entspricht Daten der humanen gastrischen Lipase, die ebenfalls keine O-Glykosylierung aufwies (Wicker-Planquardt *et al.*, 1999).

Die sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen der lysosomalen Lipase (N9, N45, N74, N134, N246 und N294) wurden zunächst einzeln mutagenisiert. Untersuchungen der Enzymaktivitäten mit den Substraten der lysosomalen Lipase, Triolein und Cholesteryloleat, zeigten, daß die Mutanten N134Q und N246Q sowohl im Zellkulturüberstand als auch im Zellextrakt keine Aktivität aufweisen. Im SDS-PAGE und im Western Blot von aufgereinigten Mutanten und Wildtypilipase aus Zellkulturüberstand konnten diese beiden Mutanten ebenfalls nicht detektiert werden. Im Western Blot aus Zellextrakt zeigten sich bei der Mutante N134Q nur schwache Banden von Degradationsprodukten; bei N246Q fand sich eine schwach ausgeprägte Bande auf der Höhe maturer rekombinanter lysosomaler Lipase. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Positionen N134 und N246 in der lysosomalen Lipase glykosyliert sind. Aufgrund der fehlenden Glykosylierung werden die Mutanten jedoch nicht korrekt gefaltet und deshalb bereits intrazellulär degradiert.

Der Nachweis von Zuckerresten, die lysosomale Proteine vor proteolytischer Degradation schützen, gelang bereits 1986 (Barriocanal *et al.*, 1986). Bei den lysosomalen assoziierten Membranproteinen (LAMP) konnte vor kurzem gezeigt werden, daß die N-Glykosylierungsreste vor Proteolyse im sauren Milieu schützen (Kundra u. Kornfeld, 1999). Die fehlende Sekretion von Enzymen nach N->Q-zielgerichteter Mutagenese wurde neben der humanen gastrischen Lipase auch für die Lipoproteinlipase und die hepatische Lipase beschrieben (Ben-Zeev *et al.*, 1994). Die Mutante N319Q der Dipeptidyl Peptidase IV zeigte keinerlei Restaktivität im Vergleich zum Wildtypenzym; hieraus wurde der Schluß gezogen, daß diese Glykosylierungsstelle für den Transportweg des Proteins und seine korrekte Faltung essentiell ist (Fan *et al.*, 1997).

N9Q konnte zwar sowohl im SDS-PAGE als auch im Western Blot nachgewiesen werden, zeigte aber eine signifikant reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zur Wildtyp-

Lipase, gemessen gegenüber Triolein und Cholesteryloleat aus aufgereinigtem Zellkulturüberstand. Die Bande im silbergefärbten SDS-PAGE mit Protein aus dem Zellkulturüberstand lag zudem leicht unterhalb der des Wildtypenzym, so daß N9Q vermutlich eine reduzierte Masse aufweist. Dagegen zeigte N9Q im Zellextrakt keine reduzierte Triolein-Hydrolyse im Vergleich zu Wildtyp Lipase. Die Western Blot-Analyse des *Sf9*-Zellextraktes zeigte eine Bande auf Höhe maturaer lysosomaler Lipase. Weiterhin wurden mehrere Degradationsprodukte sowie eine Bande bei etwa 60 kDa, die nicht der lysosomalen Lipase entsprach, beobachtet. Hier ist eine Aggregatbildung zwischen maturem Enzym und Degradationsprodukten möglich.

Zur genaueren Untersuchung von N9Q wurde zunächst versucht, ein Massenspektrum dieser herzustellen und mit der Wildtyp-Masse zu vergleichen. In einem Massenspektrum dieser Mutante sollte nach Verlust der Glykosylierung eine geringere Masse als beim Wildtypenzym zu erkennen sein. Die Aufnahme des Massenspektrums scheiterte jedoch bisher an stabilisierenden Zusätzen wie Ethylenglykol und Triton X-100. Diese Substanzen sind nicht einfach zu entfernen und stören bei einer massenspektrometrischen Untersuchung.

Die N9Q-Mutante wurde detailliert untersucht, indem Doppelmutanten dieser Mutante in den möglichen Kombinationen mit den anderen Glykosylierungs-Einfachmutanten hergestellt wurden. Zum Vergleich wurden alle Mutanten der verbleibenden Kombinationen ebenfalls hergestellt und im Insektenzellsystem exprimiert.

Für die Doppelmutanten, die eine Kombination mit N9 bilden, konnte eine deutlich reduzierte Enzymaktivität sowohl aus aufgereinigtem Zellkulturüberstand als auch im Zellextrakt im Vergleich zur Wildtyp-Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dies gilt für beide Substrate der lysosomalen Lipase. Aktivitätsmessungen und Detektionen im SDS-PAGE und im Western Blot unterstützen die Hypothese, derzufolge auch N9 glykosyliert ist, für die Aktivität der lysosomalen Lipase aber nicht essentiell ist.

Für Cholesteryloleat wurde stets eine geringere Enzymaktivität der N-Glykosylierungsmutanten im Vergleich zum Wildtyp gemessen als für das Substrat Triolein. Die Cholesteryloleat-Hydrolyse scheint somit empfindlicher auf Veränderungen im Polypeptid der lysosomalen Lipase als die Triolein-Hydrolyse zu reagieren. Wahrscheinlich läßt sich damit auch die signifikant reduzierte Cholesteryloleat-Hydrolyse bei den Mutanten, die eine Kombination mit N294 eingehen, erklären. Diese wiesen eine annähernd normale Triolein-Hydrolyse sowohl nach Aufreinigung als auch im Zellextrakt auf. Kürzlich wurde außerdem beobachtet, daß die Cholesterylesterhydrolase-Aktivität

artspezifische Unterschiede aufweist (Groener *et al.*, 2000). Bei Messungen der Substratspezifität der lysosomalen Lipase in Mensch und Maus wurde gezeigt, daß die lysosomale Lipase in der Maus eine wesentlich geringere Cholesteryloleat-Hydrolyse als beim Menschen zeigte, Triolein-Hydrolyse zeigte keine Unterschiede. Nach zielgerichteter Mutagenese wurde hierfür ein nicht-konservierter Cysteinrest in Position 240 für die Cholesteryloleatesterhydrolase-Aktivität in humaner lysosomaler Lipase verantwortlich gemacht (Groener *et al.*, 2000).

Aufgrund der vorliegenden Kristallstruktur der humanen gastrischen Lipase (Canaan *et al.*, 1999; Miled *et al.*, 2000) und der ausgeprägten Identität und Homologie zur lysosomalen Lipase konnte ein Modell für dieses Enzym entwickelt werden (Roussel *et al.*, 1999). Im folgenden wird die Glykosylierung der lysosomalen Lipase anhand dieses Modells (vgl. auch **Abb. 3**) beschrieben und mit den Daten, die aus der zielgerichteten Mutagenese gewonnen wurden, verglichen.

Die lysosomale Lipase gehört zur Gruppe der Serin-Esterasen, die konservierte Serin-Reste besitzt. S147 der katalytischen Triade ist unter einem Segment verborgen, bestehend aus 30 Aminosäureresten, das als „lid“ bezeichnet wird und zur „cap“-Domäne gehört. Die räumliche Beweglichkeit des „lids“ ist für die Substratinteraktion mit S147 unumgänglich. Möglicherweise ist dabei eine N-Glykosylierung an Position 134 involviert; fehlt dort der Zuckerrest, kann keine Substratbindung erfolgen und das Enzym wäre nicht mehr funktionstüchtig. Das Enzym würde proteolytisch degradiert werden.

N246Q zeigte wie N134Q keinerlei Enzymaktivität und war nur schwach intrazellulär im Western Blot nachweisbar. Somit kann auch N246 als glykosyliert angesehen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen zur humanen gastrischen Lipase. N246 ist in den bekannten sauren Esterasen hochkonserviert. Zum anderen liegt es in der Nähe der konservierten und in humaner gastrischer Lipase und lysosomaler Lipase für die Ausbildung einer Disulfidbrücke genutzten Cysteinreste C221 und C230. Eine Glykosylierung in Position N246 könnte für die Bildung der Disulfidbrücke wichtig sein; fehlt diese wie bei der Mutante N246Q kann das Protein nicht korrekt in seine dreidimensionale Struktur überführt und die Disulfidbrücke nicht ausgebildet werden.

Die Glykosylierungsstelle N74 ist ebenfalls zwischen lysosomaler Lipase und humaner gastrischer Lipase konserviert; N74 ist in der humanen gastrischen Lipase glykosyliert (Wicker-Planquardt *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der zielgerichteten Mutagenese der lysosomalen Lipase lassen jedoch den Schluß zu, daß N74 bei der lysosomalen Lipase nicht genutzt wird. Aus den bekannten Daten zur Struktur beider

Enzyme läßt sich der Unterschied nicht eindeutig erklären. Da das computer-generierte Modell hierfür nicht geeignet ist, könnte die reale Röntgenstrukturanalyse der lysosomalen Lipase zu einer Aussage führen.

N45Q der lysosomalen Lipase zeigte eine Triolein-Hydrolyse, die im Mittel knapp oberhalb der Wildtypaktivität lag. In der Cholesteryloleat-Hydrolyse war kein signifikanter Unterschied bezogen auf Wildtyp lipase festzustellen. Diese Glykosylierungsstelle wird somit wahrscheinlich nicht genutzt. Das deckt sich mit Daten zur humanen gastrischen Lipase. Auch dort wird die N45-Glykosylierungsstelle nicht genutzt.

Die Glykosylierungsstelle N294 liegt im Zentrum einer α -Helix und ist zwischen lysosomaler Lipase und humaner gastrischer Lipase nicht konserviert. Die Daten zur lysosomalen Lipase belegen, daß diese Position nicht glykosyliert ist. Die räumliche Nähe von N294 zur „Core“-Domäne II (beginnend bei V309) verhindert möglicherweise die Anbindung von Zuckerresten. Die direkte Folge von zwei Prolinresten auf die Konsensussequenz erschwert ebenfalls die mögliche Ausbildung einer N-Glykosylierung. Möglicherweise spielt dort auch die Beobachtung eine Rolle, daß C-terminale Glykosylierungsstellen oft nicht genutzt werden (Reddy *et al.*, 1999).

Die Glykosylierungsstelle N9 ist räumlich auf derselben Seite des Enzyms lokalisiert wie N246. Obwohl sich N9 und N134 auf dem „core“ des Proteins befinden, N246 hingegen zur „cap“ Domäne gehört, befinden sich die Glykanketten von N9 und N246 in engem Kontakt zueinander, was eine mögliche Interaktion zwischen „core“ und „cap“ fördert. Durch kinetische Untersuchungen von N9-Glykosylierungsmutanten und ihren Kombinationen konnte gezeigt werden, daß zwar die Affinität zwischen mutiertem Enzym und Substrat im Vergleich zum Wildtypenzym durch die Mutation nicht verändert wird (in etwa identische Michaelis-Konstanten K_M). Die v_{max} der Mutante N9 war jedoch deutlich niedriger. Möglicherweise ist bei der N9Q-Mutante die Interaktion zwischen „core“ und „cap“ gestört. Dies könnte zur Folge haben, daß sich das „lid“, unter dem das katalytische Serin verborgen liegt, langsamer öffnet. Dies kann die verringerte Aktivität dieser Mutanten erklären. N9 liegt außerdem in dem als Propeptid der lysosomalen Lipase angenommenen Bereich. Die N-Glykosylierung eines Propeptids lysosomaler Enzyme wurde beim humanen Cathepsin F beschrieben (Wang *et al.*, 1998). Genauere Daten zur möglichen Funktion von Glykanketten von Propeptiden liegen nicht vor. Möglicherweise werden sie weniger für den Transport oder die Prozessierung des

Proteins als vielmehr zum Schutz vor prämaturer proteolytischer Spaltung benötigt (Glathe *et al.*, 1998).

4.3. N-terminale Prozessierung

Bei der Reinigung der lysosomalen Lipase aus humaner Leber war neben der 56 kDa-Form eine weitere Form nachgewiesen worden, deren N-Terminus 50 Aminosäuren C-terminal des putativen N-Terminus lag. Beide Enzymformen zeigten jedoch keinen Unterschied in der lipolytischen Aktivität. Dies deutete darauf hin, daß der N-Terminus nicht an der Katalyse beteiligt war und strukturell keinen entscheidenden Einfluß hatte. Eine N-terminale Prozessierung wurde bereits für eine Reihe von lysosomalen Proteinen beschrieben. Bei Cathepsin D setzt die spezifische Abspaltung eines Propeptides erst das katalytisch aktive Enzym frei (Gieselmann *et al.*, 1983; Richo u. Conner, 1994). Weitere Beispiele sind die α -Fukosidase (Johnson *et al.*, 1991) und die β -Glukoronidase (Gabel u. Foster, 1987). Bei der Expression einer extrazellulären Endoprotease von *Aeromonas caviae* T-64 in *E. coli* konnte neben einem N-terminalen Propeptid auch ein C-terminales Propeptid nachgewiesen werden. Das C-terminale war im Gegensatz zum N-terminalen Propeptid nicht essentiell für die korrekte Faltung und Ausbildung des aktiven Enzyms (Nirasawa *et al.*, 1999). Auch bei der prägastrischen Lipase des Schafes wurde eine N-terminale Prozessierung beobachtet. Bei der Reinigung des Enzyms fand sich eine unspezifische Prozessierung des N-Terminus, wodurch die molekulare Masse von 50 kDa auf 45 kDa abnahm (De Caro *et al.*, 1995).

Bei der im Insektenzellsystem exprimierten rekombinanten lysosomalen Lipase wurde im Gegensatz zur lysosomalen Lipase aus humaner Leber keine Prozessierung nach Abspaltung des Signalpeptids festgestellt. Dies wurde durch Eigenschaften des Baculovirus-Expressionssystems erklärt.

4.3.1. Zielgerichtete Mutagenese der Prozessierungsstelle K49/G50 und Untersuchung der Mutante $\Delta 49$

Die bei der lysosomalen Lipase aus humaner Leber beobachtete Prozessierung zwischen den Aminosäureresten K49 und G50 konnte bei der im Insektenzellsystem

4. Diskussion

exprimierten lysosomalen Lipase nicht beobachtet werden. Es wurden daher die Aminosäurereste K49 und G50, wie in **Abb. 30** dargestellt, mutagenisiert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Struktur und Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren so wenig wie möglich zu verändern, damit die Struktur des maturen Proteins nicht bereits durch den Aminosäureaustausch *per se* gestört wird. Es wurde außerdem die Mutante $\Delta 49$ kloniert und exprimiert, der die 49 Aminosäuren der Propeptidsequenz fehlen. Mit Hilfe dieser drei Mutanten sollten erste Aussagen zur Funktion der Propeptidsequenz der lysosomalen Lipase gewonnen werden.

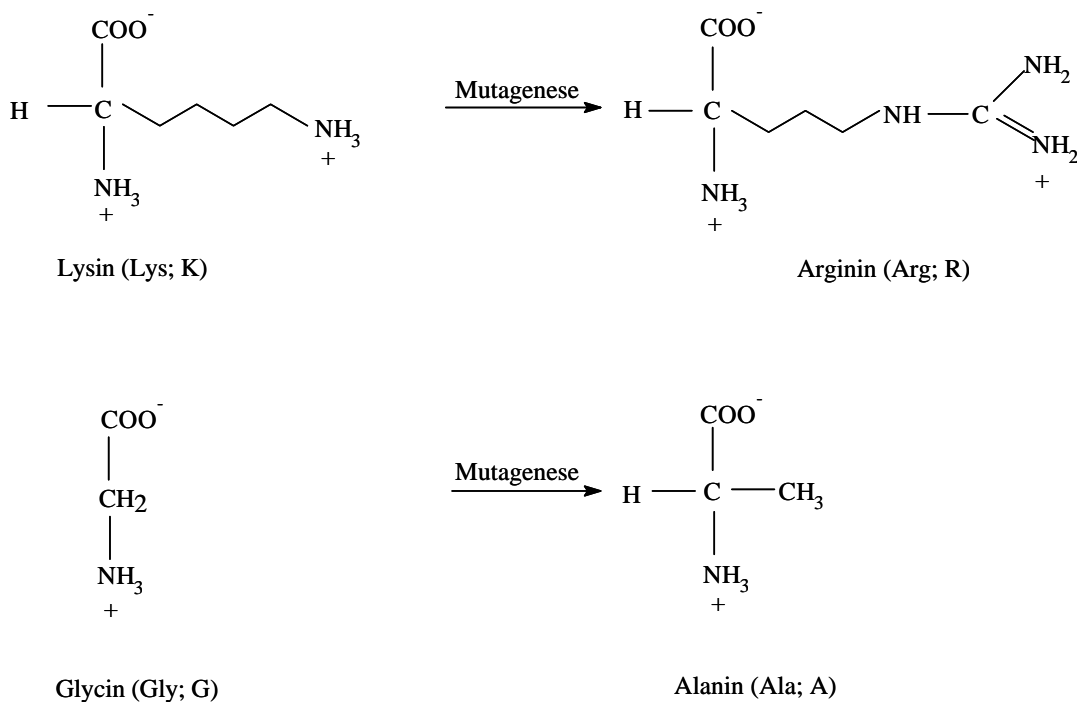


Abb. 30. Strukturformeln der ausgetauschten Aminosäuren an der Prozessierungsstelle.
Die Richtung des Austausches wird durch den Pfeil gezeigt. Glycin und Alanin besitzen jeweils unpolare Seitenketten. Lysin und Arginin haben beide geladene polare Seitenketten.

Es wurde hierbei gezeigt, daß die Mutante K49R Wildtypaktivität besitzt. Sie scheint somit keine Rolle bei der Prozessierung der lysosomalen Lipase zu spielen. Die Mutante $\Delta 49$ hingegen zeigte im Vergleich zum Wildtypenzym keine enzymatische Aktivität. Das Propeptid scheint also für die Ausbildung einer aktiven lysosomalen Lipase wichtig zu sein. Für diese Aussage gibt es bei anderen Proteinen zahlreiche Belege. Es scheint aber die Abspaltung des Propeptids zur Ausbildung eines aktiven Enzyms von Bedeutung zu sein. So ist die Prozessierung des Propeptids bei Cathepsin D für die Ausbildung der

vollen Aktivität des muren Enzyms essentiell (Wittlin *et al.*, 1999). Eine Deletionsmutante des Cathepsin D, dem die Propeptidsequenz entfernt wurde, bildete kein aktives Enzym (Conner, 1992). Offensichtlich muß eine Propeptidsequenz grundsätzlich vorhanden sein; andererseits muß das Propeptid aber auch abgespalten werden, damit ein aktives Enzym entsteht.

Bei der lysosomalen Lipase, die im Insektenzellsystem exprimiert wird, scheint die Situation etwas anders zu sein. Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigen, muß ein Propeptid zur Bildung eines aktiven Enzyms vorhanden sein. Die Abspaltung des Propeptids war jedoch für die Ausbildung der enzymatischen Aktivität der rekombinanten lysosomalen Lipase nicht erforderlich.

Die Mutante $\Delta 49$ konnte im Gegensatz zur Wildtypipase und zur K49R-Mutante nach Aufreinigung mit Hilfe der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie nicht im Western Blot mit dem α -His₆-Antikörper detektiert werden. Das deutet auch auf eine fehlende Sekretion dieser Mutante hin. Es wurde oben beschrieben, daß die Ausbildung eines aktiven, korrekt gefalteten Konformers für Aktivität und Transport eines Enzyms von eminenter Bedeutung ist. Hierbei spielt nicht nur die Glykosylierung eine wichtige Rolle; auch Propeptide reduzieren oder verhindern die Proteindegradation. Dies gilt vor allem, wenn das N-terminale Propeptid an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden ist, wie im Falle der Protease Phytpepsin (Glathe *et al.*, 1998).

Die Mutante G50A der lysosomalen Lipase konnte nicht im Western Blot visualisiert werden und zeigte in der Triolein-Hydrolyse nur eine Restaktivität von 14% im Vergleich zur Wildtypipase. Wahrscheinlich spielt die G50-Position somit eine besondere Rolle bei der Prozessierung der lysosomalen Lipase. Vergleicht man die Sequenzen von humaner gastrischer Lipase, gastrischer Lipase des Kaninchens und des Hundes, der linguale Lipase der Ratte, die prägastrische Lipase des Kalbs mit der der humanen lysosomalen Lipase, so stellt man fest, daß sich diese Prozessierungsstelle in der „core“-Domäne I genau zwischen zwei β -Faltblättern befindet. In dieser Lokalisation ist sie für proteolytische Enzyme leicht zugänglich. Außerdem ist der Aminosäurerest G50 in den genannten Lipasen hochkonserviert. K49 der humanen lysosomalen Lipase findet sich jedoch in keinen anderen der genannten Proteine an derselben Position (Roussel *et al.*, 1999). Möglicherweise ist G50 eine Art „Marker-Aminosäure“, die den prozessierenden Enzymen als Erkennungs-Signal dient. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, ist in weiteren Untersuchungen eine systematische zielgerichtete

Mutagenese dieser Position gegen alle noch verbleibenden Aminosäuren geplant. Hierbei soll untersucht werden, wie sich andere Mutationen auf die Enzymaktivität der lysosomalen Lipase auswirkt. Desweiteren ist geplant, neben der Triolein-Hydrolyse auch die Cholesteryl-oleat-Hydrolyse zu untersuchen. Auch die Bestimmung der Kinetik dieser Prozessierungsmutanten und die Untersuchung der Aktivitäten im Zellextrakt sollen erfolgen.

4.4. Mutationen bei Cholesterolester-Speicherkrankheit (CESD) und Wolman'scher Erkrankung

Genetische Defekte einer lysosomalen Hydrolase resultieren in der lysosomalen Akkumulation von Substraten. Es sind über vierzig lysosomale Speicherkrankheiten bekannt, die in einer Häufigkeit von 1:7000-8000 Geburten auftreten (Winchester *et al.*, 2000). Die Defizienz der lysosomalen Lipase führt in beinahe allen Geweben zur Akkumulation von Cholesterolestern und Triglyzeriden in den Lysosomen und führt zur Entstehung zweier Krankheitsbilder:

- (1) Cholesterolester-Speicherkrankheit und
- (2) Wolman'sche Erkrankung (WD).

Einen Überblick zur Entstehung und Symptomatik dieser Krankheiten und zu molekularbiologischen Aspekten gaben (Assmann u. Seedorf, 1995). Es wurden eine Reihe von Mutationen identifiziert und charakterisiert (s. Einleitung, Abschnitt 1.5.), die zu Verlusten in der Aktivität der lysosomalen Lipase führten und für die genannten Phänotypen verantwortlich gemacht wurden. Die Wolman'sche Erkrankung ist die schwerere Form der lysosomalen Speicherkrankheit, die auf einer Defizienz der lysosomalen Lipase beruht; sie führt postnatal innerhalb weniger Monate zum Tod der Kinder und ist durch einen vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms bedingt. Dagegen besitzt die lysosomale Lipase bei der Cholesterolester-Speicherkrankheit, die auch im höheren Lebensalter auftritt und diagnostiziert werden kann, noch eine Restaktivität (Aslanidis *et al.*, 1996; Redonnet-Verhet *et al.*, 1997).

Die Glykosylierungsstellen und auch die Positionen der Prozessierung der lysosomalen Lipase unterliegen, wie jede Position der DNA, potentiell der Gefahr von Mutationen, die durch Strahlung, Umweltgifte und fehlende oder mangelhafte Reparatur

von Zellteilungsfehlern in der DNA auftreten können. Bisher sind für die lysosomale Lipase an den beschriebenen drei Glykosylierungsstellen und der Prozessierungsstelle keine natürlichen Mutationen bekannt (Stand: März 2001). Für die Lipoproteinlipase konnte jedoch an N43 eine Mutation bei einem Patienten nachgewiesen werden, der hohe Cholesterol- und Triglyzerid-Werte im Plasma aufwies. N43 war N-glykosyliert, und eine transiente Expression dieser Mutante führte zur Bildung einer inaktiven Lipoproteinlipase (Kobayashi *et al.*, 1994).

Interessant ist auch die L273-Mutation der lysosomalen Lipase, die zu einer neuen N-Glykosylierungsstelle führt und bei einem Patienten mit Cholesterolester-Speicherkrankheit nachgewiesen wurde. Die Mutante L273S wurde in HeLa-Zellen exprimiert und zeigte eine deutlich größere molekulare Masse als im selben System exprimiertes Wildtypenzym (Pariyath *et al.*, 1996). Aus dem dreidimensionalen Modell der lysosomalen Lipase kann abgeleitet werden, daß der zusätzliche Zuckerrest auf der Oberfläche des Moleküls liegt. Hierdurch könnte der voluminöse Zuckerrest die Substratbindung oder die Bewegung des „lids“ erschweren und zu dem enzymatisch inaktiven Enzym und klinisch zur Cholesterolester-Speicherkrankheit führen (Roussel *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, welche Auswirkungen ein Aminosäureaustausch an bestimmten Positionen im Molekül der lysosomalen Lipase haben kann. So führten Mutationen bei N134 und N246, ebenso bei $\Delta 49$ zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms, sowohl der Triolein-Hydrolyse als auch der Cholesteryloleat-Hydrolyse. Eine Mutation an dieser Position könnte also zum Wolman-Phänotyp führen, während eine Mutation bei N9 (und G50) die Cholesterolester-Speicherkrankheit verursachen könnte, weil das Enzym bei Mutationen diese Positionen noch Restaktivitäten aufwies.

Eine Mutante der lysosomalen Lipase (Deletion von 24 Aminosäuren im Exon 8) führte jedoch bei unterschiedlichen Patienten sowohl zum Phänotyp der Wolman'schen Erkrankung als auch zur Cholesterolester-Speicherkrankheit. Zusätzlich zeigte diese Mutante, exprimiert in Insektenzellen, keine Aktivität, wohingegen in Fibroblasten eine Restaktivität nachweisbar war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß neben verringerten Werten für die Aktivität der lysosomalen Lipase auch andere Faktoren für die Ausbildung des Erkrankungstyps eine Rolle spielen (Du *et al.*, 1998). Folglich ist es gegenwärtig nicht direkt möglich, von Aktivitätsbestimmungen ausgehend, einen Phänotyp vorherzusagen. Vielmehr müssen nach der Bestimmung des Krankheitstyps die

4. Diskussion

molekularen Ursachen erforscht und dabei nicht nur die Aktivität der lysosomalen Lipase betrachtet werden. Es muß weiter untersucht werden, welche Faktoren für die Ausbildung von Wolman'scher Erkrankung oder Cholesterolester-Speicherkrankheit entscheidend sind.

5. Literaturverzeichnis

Abramov G, Schorr S, Wolman M (1956) Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *Am J Dis Child* 91:282-286

Aeed PA, Elhammer AP (1994) Glycosylation of recombinant prorenin in insect cells: the insect cell line Sf9 does not express the Mannose 6-phosphate recognition signal. *Biochemistry* 33:8793-8797

Alexander WS (1946) Niemann-Pick-disease: Report of a case showing calcification in the adrenal glands. *N Z Med J* 45:43-46

Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH, März L (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* 16:109-123

Ameis D, Brockmann G, Knoblich R, Merkel M, Ostlund RE, Yang JW, Coates PM, Cortner JA, Feinman SV, Greten H (1995) A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res* 36:241-250

Ameis D, Greten H, Schotz MC (1992) Hepatic and plasma lipases. *Semin Liver Dis* 12:397-402

Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, Greten H (1994) Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. *Eur J Biochem* 219:905-914

Anderson RA, Byrum RS, Coates PM, Sando GN (1994) Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2718-2722

- Anderson RA, Rao N, Byrum RS, Rothschild CB, Bowden DW, Hayworth R, Pettenati M (1993) In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesterol esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3. *Genomics* 15:245-247
- Anderson RA, Sando GN (1991) Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase. *J Biol Chem* 266:22479-22484
- Aslanidis C, Ries S, Fehringer P, Büchler C, Klima H, Schmitz G (1996) Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal lipase activity. *Genomics* 33:85-93
- Assmann G (1982) *Lipidstoffwechsel und Atherosklerose*. Stuttgart, Schattauer
- Assmann G, Seedorf U (1995) Acid lipase deficiency: Wolman Disease and Cholesterol Ester Storage Disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp 2563-2587
- Barriocanal JG, Bonifacino JS, Yuan L, Sandoval IV (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem* 261:16755-16763
- Beisiegel U (1992) Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors. In: Rosseneu M (eds) *Structure and function of apolipoproteins*. CRC Press, Boca Raton, pp 269-292
- Beisiegel U (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 6:117-122
- Beisiegel U, Ameis D, Will H, Greten H (1995) Hypertriglyceridämie und Arteriosklerose. *Physiologie und Pathophysiologie des Chylomikronenkatabolismus*. *Internist* 36:357-361

- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341:162-164
- Belfrage P, Vaughan M (1969) Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10:341-344
- Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, C. DR, Doolittle MH (1994) Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res* 35:1511-1523
- Breslow JL (1989) Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest* 84:373-380
- Brooks B, Weinhold PA (1986) The activity and properties of an acidic triacylglycerol lipase from adult and fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 875:39-47
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47
- Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1981) Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212:628-635
- Brown WJ, Sgoutas DS (1980) Purification of rat liver lysosomal cholesteryl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 617:305-317
- Burke JA, Schubert WK (1972) Deficient activity of hepatic acid lipase in cholesterol ester storage disease. *Science* 176:309-310
- Burton BK, Mueller HW (1980) Purification and properties of human placental acid lipase. *Biochim Biophys Acta* 618:449-460
- Busca R, Pujana MA, Pognonec P, Auwerx J, Deeb SS, Reina M, Vilaro S (1995) Absence of N-glycosylation at asparagine 43 in human lipoprotein lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic reticulum and alters this cellular compartment. *J Lipid Res* 36:939-951

- Canaan S, Roussel A, Verger R, Cambillau C (1999) Gastric lipase: crystal structure and activity. *Biochim Biophys Acta* 1441:197-204
- Cheng D, Chang CCY, Qu X, Chang T-Y (1995) Activation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase by cholesterol or by oxysterol in a cell-free system. *J Biol Chem* 270:685-695
- Coates PM, Langer T, Cortner JA (1986) Genetic variation of human mononuclear leukocyte lysosomal acid lipase activity. Relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 62:11-20
- Comer FI, Hart GW (2000) O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J Biol Chem* 275:29179-29182
- Conner GE (1992) The role of cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome. *J Biol Chem* 267:21738-21745
- Cooper AD (1990) Hepatic lipoprotein and cholesterol metabolism. In: Zakim D, Boyer TD (eds) *Hepatology. A textbook of liver disease*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 96-123
- Cuozzo JW, Sahagian GG (1994) Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins. *J Biol Chem* 269:14490-14496
- De Caro F, Ferrato F, Verger R, De Caro A (1995) Purification and molecular characterization of lamb pregastric lipase. *Biochim Biophys Acta* 1252:321-329
- Dienst H, Hamperl H (1927) Über einen Fall von lipoidzelliger Splenohepatomegalie vom Typus Niemann-Pick. *Wien Klin Wochenschr* 40:1432-1441
- Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R, von Figura K (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose-6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci* 112:1591-1597

- Du H, Sheriff S, Bezerra J, Leonova T, Grabowski GA (1998) Molecular and enzymatic analyses of lysosomal acid lipase in Cholesteryl Ester Storage Disease. *Mol Genet Metab* 64:126-134
- Du H, Witte DP, Grabowski GA (1996) Tissue and cellular specific expression of murine lysosomal acid lipase mRNA and protein. *J Lipid Res* 37:937-949
- Dwek RA, Edge CJ, Harvey DJ, Wormald MR, Parekh RB (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 62:65-100
- Ellender M, Chlumska A, Ledvinova J, Poupetova H (2000) Testis - a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. *Virchows Arch* 436:82-87
- Fan H, Meng W, Kilian C, Grams S, Reuter W (1997) Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur J Biochem* 246:243-251
- Ferlinz K, Hurwitz R, Moczall H, Lansmann S, Schuchman EH, Sandhoff K (1997) Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem* 243:511-517
- Fielding CJ, Fielding PE (1985) Metabolism of cholesterol and lipoproteins. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Benjamin Cummings, Menlo Park, pp 404-474
- Fortenberry SC, Schorey JS, Chirgwin JM (1995) Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J Cell Sci* 108:2001-2006
- Fraser MJ (1992) The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Topics Microbiol Immunol* 158:131-172
- Fredrickson DS (1963) Newly recognized disorders of cholesterol metabolism. *Ann Int Med* 58:718-723

- Freeman MW (1994) Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol* 5:143-148
- Gabel CA, Foster SA (1987) Postendocytic maturation of acid hydrolases: evidence of prelysosomal processing. *J Cell Biol* 105:1561-1570
- Gavel Y, von Heijne G (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3:433-442
- Geisse S, Kocher HP (1999) Protein expression in mammalian and insect cell systems. *Methods Enzymol* 306:19-42
- Gieselmann V, Pohlmann R, Hasilik A, von Figura K (1983) Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 97:1-5
- Gil G, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1988) Purification of a protein doublet that binds to six TGG-containing sequences in the promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase. *J Biol Chem* 263:19009-19015
- Ginsberg HN (1990) Lipoprotein physiology and its relationship to atherogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19:211-228
- Glathe S, Kervinen J, Nimtz M, Li GH, Tobin GJ, Copeland TD, Ashford DA, Wlodawer A, Costa J (1998) Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinase phytepsin in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Chem* 273:31230-31236
- Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS (1975) Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoproteins. *J Biol Chem* 250:8487-8795
- Grinnell BW, Walls JD, Gerlitz B (1991) Glycosylation of human protein c affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J Biol Chem* 266:9778-9785

- Groener JE, Bax W, Stuani C, Pagani F (2000) Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low-affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase. *Biochim Biophys Acta* 1487:155-162
- Grosser J, Schrecker O, Greten H (1981) Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 22:437-442
- Gupta R, Birch H, Rapacki K, S. B, Hansen JE (1999) O-GLYCBASE version 4.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res* 27:370-372
- Hajjar DP (1994) Regulation of cholesteryl ester hydrolases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 69:45-82
- Haley NJ, Fowler S, de Duve C (1980) Lysosomal acid cholesterol esterase activity in normal and lipid-laden aortic cells. *J Lipid Res* 21:961-969
- Harte RA, Hulten LM, Lindmark H, Reue K, Schotz MC, Khoo J, Rosenfeld ME (2000) Low-level expression of hormone-sensitive lipase in arterial macrophage-derived foam-cells: potential explanation for low-rates of cholesteryl ester hydrolysis. *Atherosclerosis* 149:343-350
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34:1345
- Hide WA, Chan L, Li WH (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33:167-178
- Imanaka T, Amanuma-Muto K, Ohkuma S, Takano T (1984) Characterization of lysosomal acid lipase purified from rabbit liver. *J Biochem* 96:1089-1101
- Ioffe E, Stanley P (1994) Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:728-732

Johnson KF, Hancock LW, Dawson G (1991) Synthesis and processing of lysosomal alpha-fucosidase in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1073:120-128

Kasturi L, Eshleman JR, Wunner WH, Shakin-Eshleman SH (1995) The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein. *J Biol Chem* 270:14756-14761

Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, d'Auriol L, Andalibi A *et al.* (1989) Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9647-9651

Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanashi H, Uratsuji Y, Nomuraa H, Takeyama Y, Nishizuka Y (1985) Studies on the phosphorylation of myelin basic protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260:12492-12499

Kobayashi J, Inadera H, Fujita Y, Talley G, Morisaki N, Yoshida S, Saito Y, Fojo SS, Brewer J, B. H. (1994) A naturally occurring mutation at the second base of codon Asparagine 43 in the proposed N-linked glycosylation site of human lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 205:506-515

Kornfeld S (1986) Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77:1-6

Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5:483-525

Krivit W, Peters C, Dusenbery K, Ben-Yoseph Y, Ramsay NKC, Wagner JE, Anderson R (2000) Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26:567-570

- Kundra R, Kornfeld S (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* 274:31039-31046
- Kuriyama M, Yoshida H, Suzuki M, Fujiyama J, Igata A (1990) Lysosomal acid lipase deficiency in rats: lipid analyses and lipase activities in liver and spleen. *J Lipid Res* 31:1605-1612
- Kuroda K, Geyer H, Geyer R, Doerfler W, Klenk HD (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector. *Virology* 174:418-429
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lindhorst TK (2000) *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. Weinheim, Wiley-VCH
- Lingappa VR, Blobel G (1980) Early events in the biosynthesis of secretory and membrane proteins: the signal hypothesis. *Recent Prog Horm Res* 36:451-475
- Lohse P, Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Seidel D (1997a) The acid lipase gene family: three enzymes, one highly conserved gene structure. *J Lipid Res* 38:880-891
- Lohse P, Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Seidel D (1997b) Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity. *J Lipid Res* 38:1896-1905
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241
- Mayatepek E, Seedorf U, Wiebusch H, Lenhartz H, Assmann G (1999) Fatal genetic defect causing Wolman disease. *J Inherit Metab Dis* 22:93-94

- Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH (1998) The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37:6833-6837
- Merkel M, Tilkorn A-C, Greten H, Ameis D (1999) Lysosomal acid lipase: assay and purification. In: Doolittle M, Reue K (eds) *Lipase and Phospholipase protocols*. Humana press, Totowa, pp 95-107
- Messieh S, Clarke J, Cook HW, Spence MW (1983) Abnormal neutral lipase activity in acid-lipase-deficient cultured human fibroblasts. *Pediatr Res* 17:770-774
- Miled N, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Riviere M, Carriere F, de Caro A, Cambillau C, Verger R (2000) Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* 82:973-986
- Millán JL (1986) Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 261:3112-3115
- Nagai K, Ihara Y, Wada Y, Taniguchi N (1997) N-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology* 7:769-776
- Nakagawa H, Matsubara S, Kuriyama M, Yoshidome H, Fujiyama J, Yoshida H, Osame M (1995) Cloning of rat lysosomal acid lipase cDNA and identification of the mutation in the rat model of Wolman's disease. *J Lipid Res* 36:2212-2218
- Nehrke K, Hagen FK, Tabak LA (1996) Charge distributions of flanking amino acids influences O-glycan acquisition *in vivo*. *J Biol Chem* 271:7061-7065
- Nilsson-Ehle P, Schotz MC (1976) A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17:536-541
- Nirasawa S, Nakajima Y, Zhang Z-Z, Yoshida M, Hayashi K (1999) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the extracellular endoprotease of *Aeromonas*

- caviae* T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1433:335-342
- Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, Dwek RA (1993) Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J* 7:1330-1337
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1994) *Baculovirus Expression, A Laboratory Manual*. New York, Oxford University Press
- Ozasa S, Kempner ES, Erickson SK (1989) Functional size of acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase by radiation inactivation. *J Lipid Res* 30:1759-1762
- Pagani F, Garcia R, Pariyarath R, Stuani C, Gridelli B, Paone G, F.E. B (1996) Expression of lysosomal acid lipase mutants detected in three patients with cholesteryl ester storage disease. *Hum Mol Genet* 5:1611-1617
- Pajot-Augy E, Bozon V, Remy JJ, Couture L, Salesse R (1999) Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* 260:635-648
- Pariyarath R, Pagani F, Stuani C, Garcia R, F.E. B (1996) L273S missense substitution in human lysosomal acid lipase creates a new N-glycosylation site. *FEBS Lett* 397:79-82
- Patrick AD, Lake BD (1969) Deficiency of an acid lipase in Wolman's disease. *Nature* 222:1067-1068
- Patschinsky T, Hunter T, Esch FS, Cooper JA, Sefton BM (1982) Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:973-977
- Paulson JC (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 272-276

5. Literaturverzeichnis

- Pinna LA (1990) Casein kinase II: an "eminence grise" in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054:267-284
- Pittman RC, Khoo JC, Steinberg D (1975) Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 250:4505-4511
- Qu S-J, Fan H-Z, Blanco-Vaca F, Pownall HJ (1993) Effects of site-directed mutagenesis on the N-glycosylation sites of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 32:8732-8736
- Reddy A, Gibbs BS, Liu Y-L, Coward JK, Changchien L-M, Maley F (1999) Glycosylation of the overlapping sequons in yeast external invertase: effect of amino acid variation on site selectivity in vivo and in vitro. *Glycobiology* 9:547-555
- Redonnet-Vernhet I, Chatelut M, Basile J-P, Salvayre R, Levade T (1997) Cholesteryl ester storage disease: relationship between molecular defects and *in situ* activity of lysosomal acid lipase. *Biochem Mol Med* 62:42-49
- Redonnet-Vernhet I, Chatelut M, Salvayre R, Levade T (1998) A novel lysosomal acid lipase gene mutation in a patient with cholesteryl ester storage disease. *Hum Mutat* 11:335-336
- Richo GR, Conner GE (1994) Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem* 269:14806-14812
- Rohrer L (1991) The acetylated low-density lipoprotein receptor or macrophage scavenger receptor. *Atherosclerosis Reviews* 23:123-129
- Roussel A, Canaan S, Egloff M-P, Riviere M, Dupuis L, Verger R, Cambillau C (1999) Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J Biol Chem* 274:16995-17002

- Sakurada T, Orima H, Okabe H, Noma A, Murakami M (1976) Purification and properties of cholesterol ester hydrolase from human aortic intima and media. *Biochim Biophys Acta* 424:204-212
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory
- Sando GN, Neufeld EF (1977) Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme, α -L-Iduronidase, by cultured human fibroblasts. *Cell* 12:619-627
- Sando GN, Rosenbaum LM (1985) Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase: purification and properties of the form secreted by fibroblasts in microcarrier culture. *J Biol Chem* 260:15186-15193
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Schmitz G, Assmann G (1989) Acid lipase deficiency: Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AC, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw Hill, New York, pp 1623-1644
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 951-960
- Sheriff S, Du H, Grabowski GA (1995) Characterization of lysosomal acid lipase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* 270:27766-27772
- Shimizu H, Ueno H, Hayashi R (1999) Role of carbohydrate moiety in carboxypeptidase Y: structural study of mutant enzyme lacking carbohydrate moiety. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:1045-1050
- Smith LC, Faustinella F, Chan L (1992) Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Curr Opin Struct Biol* 2:490-496

5. Literaturverzeichnis

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchinonic acid. *Anal Biochem* 150:76-85

Steinberg D (1991) Lipoprotein modification and atherogenesis. *Atherosclerosis Reviews* 23:115-121

Sugahara T, Pixley MR, Fares F, Boime I (1996) Characterization of the O-glycosylation sites in the chorionic gonadotropin beta subunit *in vivo* using site-directed mutagenesis and gene transfer. *J Biol Chem* 271:20797-20804

Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 270:15747-15754

Tilkorn A-C, Merkel M, Greten H, Ameis D (1999) High-level baculoviral expression of lysosomal lipase. In: Doolittle M, Reue K (eds) *Lipase and Phospholipase protocols*. Humana press, Totowa, pp 177-185

Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:151-208

Van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel J-M, Cambillau C (1993) Lipoprotein lipase: A molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: Consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem* 269:4626-4633

Verhoeven AJM, Neve BP, Jansen H (1999) Secretion and apparent activation of human hepatic lipase requires proper oligosaccharide processing in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 337:133-140

von Heijne G (1990) The signal peptide. *J Membr Biol* 115:195-201

- Wang B, Shi G, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Brömme D (1998) Human cathepsin F. *J Biol Chem* 273:32000-32008
- Warner TG, Dambach LM, Shin HJ, O'Brien JS (1981) Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *J Biol Chem* 256:2952-2957
- Wicker-Planquardt C, Canaan S, Riviere M, Dupuis L (1999) Site-directed removal of N-glycosylation sites in human gastric lipase. *Eur J Biochem* 262:644-651
- Winchester B, Vellodi A, Young E (2000) The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem Soc Trans* 28:150-154
- Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343:771-774
- Wittlin S, Rösel J, Hofmann F, Stover DR (1999) Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation. *Eur J Biochem* 265:384-393
- Wolman M (1964) Histochemistry of lipids in pathology. In: Graumann W, Neumann K (eds) *Handbuch der Histochemie*. Fischer Verlag, Stuttgart, pp 228-232
- Yancey PG, Jerome WG (1998) Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *J Lipid Res* 39:1349-1361
- Yatsu FM, Fisher M (1989) Atherosclerosis: current concepts on pathogenesis and interventional therapies. *Ann Neurol* 26:3-12

6. Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyl-transferase
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus
Apo	Apolipoprotein
BCA	Bicinchoninsäure
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
CESD	Cholesterolesterspeicherkrankheit
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FBS	Fötale bovines Serum
HDL	High-density Lipoprotein
HGL	Humane gastrische Lipase
HL	Hormonsensitive Lipase
HHL	Humane hepatische Lipase
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A
HRP	Meerrettich Peroxidase
IDL	Intermediate-density Lipoprotein
LAL	Lysosomale saure Lipase
LAMP	Lysosomal assoziiertes Membranprotein
LB	Luria-Bertani
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase
LDL	Low-density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-receptor-related protein
NCEH	Neutrale Cholesterolester Hydrolase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Piperazindiacrylamid

RER	Rauhes Endoplasmatisches Reticulum
RES	Retikuloendotheliales System
RHVF	Rekombinantes Willebrand Faktor Reporter Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	Signal Recognition Particle
TBE	Trisbase-Borsäure-Ethylendiamin-tetraessigsäure
TE	Tris-HCl-Ethylendiamin-tetraessigsäure
Triolein	(9,10 (n)- ³ H)-oleoylglycerol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLDL	Very low-density Lipoprotein

7. Sicherheitsdaten der verwendeten Chemikalien

Acrylamid

R-Sätze: 45, 46, E24/25, E48/23/24/25

S-Sätze: 53, 45

Benzol

R-Sätze: 45, 11, E48/23/24/25

S-Sätze: 53, 43

Chloroform

R-Sätze: 47, 20/22, 38, 40, 48

S-Sätze: 53, 36/37

Diethylether

R-Sätze: 12, 19

S-Sätze: 9, 16, 29, 33

Dithiothreitol

R-Sätze: 20/21/26, 36/37/38

S-Sätze: 26, 36

Essigsäure

R-Sätze: 10, 35

S-Sätze: 23.2, 26, 36/37/39, 45

Ethanol

R-Sätze: 11

S-Sätze: 7, 16

Ethidiumbromid

R-Sätze: 22, 26, 36/37/38, 40

S-Sätze: 26, 27, 36/37/39

Formamid

R-Sätze: 61

S-Sätze: 53, 24/25, 37, 45

Glutaraldehydlösung

R-Sätze: 22, 23, 34, 42/43, 50

S-Sätze: 26, 36/37/39, 45, 61

Heptan

R-Sätze: 11, 38, 50/53, 65, 67

S-Sätze: 9, 16, 29, 33, 60, 61, 62

Imidazol

R-Sätze: 22, 34

S-Sätze: 22, 26, 36/37/39, 45

Methanol

R-Sätze: 11, 23/25

S-Sätze: 2, 7, 16, 24

Natriumdodecylsulfat

R-Sätze: 21/22, 36/38

S-Sätze: 36

Natriumhydroxid

R-Sätze: 34

S-Sätze: 26, 28.2, 36/37, 45

Phenol:Chloroform

R-Sätze: 45, 46, 23/24/25, 34

S-Sätze: 45, 26, 27, 36/37/39

Ethylendiamintetraessigsäure

R-Sätze: 22, 36/37/38

S-Sätze: 26, 36

Ethylenglykol

R-Sätze: 22

S-Sätze: -

Formaldehyd

R-Sätze: 23/24/25, 34, 39/23/24/25, 40, 43

S-Sätze: 26, 36, /37/39, 45, 51

Tris(hydroxymethyl)aminomethan

R-Sätze: 36/37/38

S-Sätze: 26, 36

Triton X-100

R-Sätze: 22, 41

S-Sätze: 24, 26, 39

2-Propanol

R-Sätze: 11, 36, 67

S-Sätze: 7, 16, 24/25, 26

Salzsäure

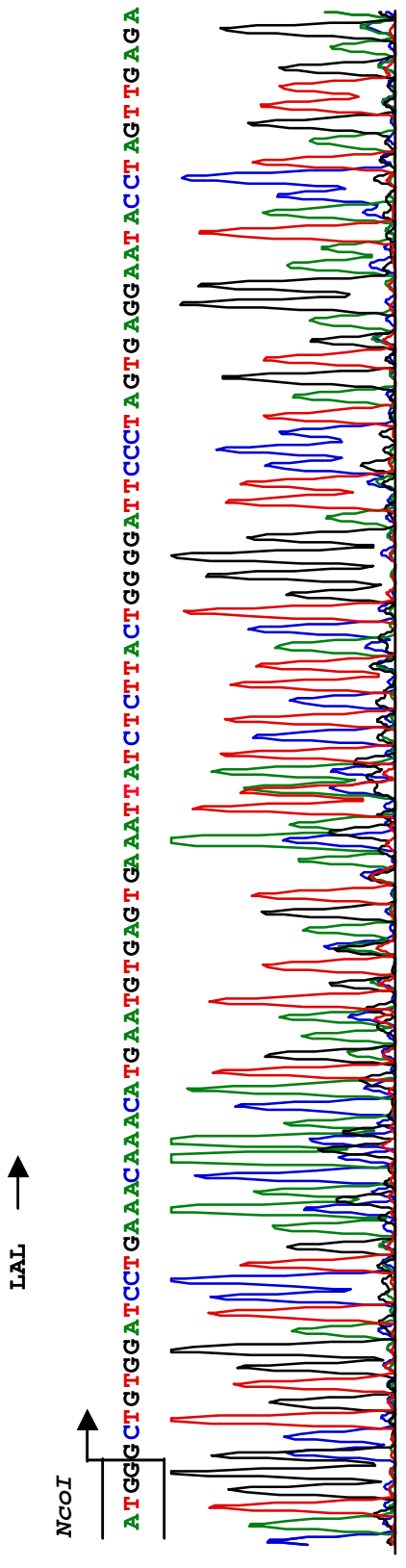
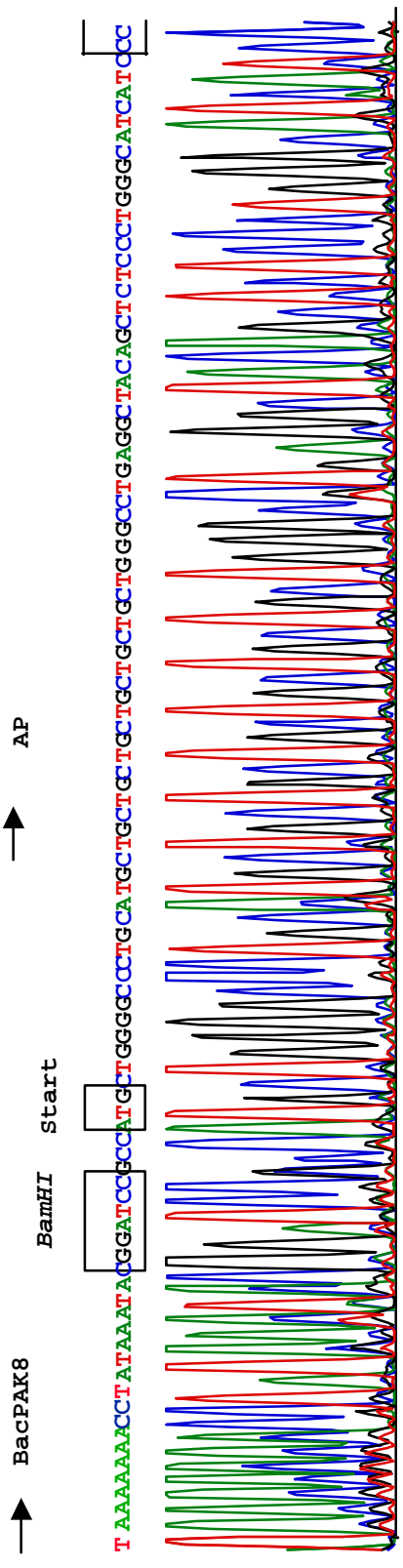
R-Sätze: 34, 37

S-Sätze: 2, 26

Silbernitratlösung

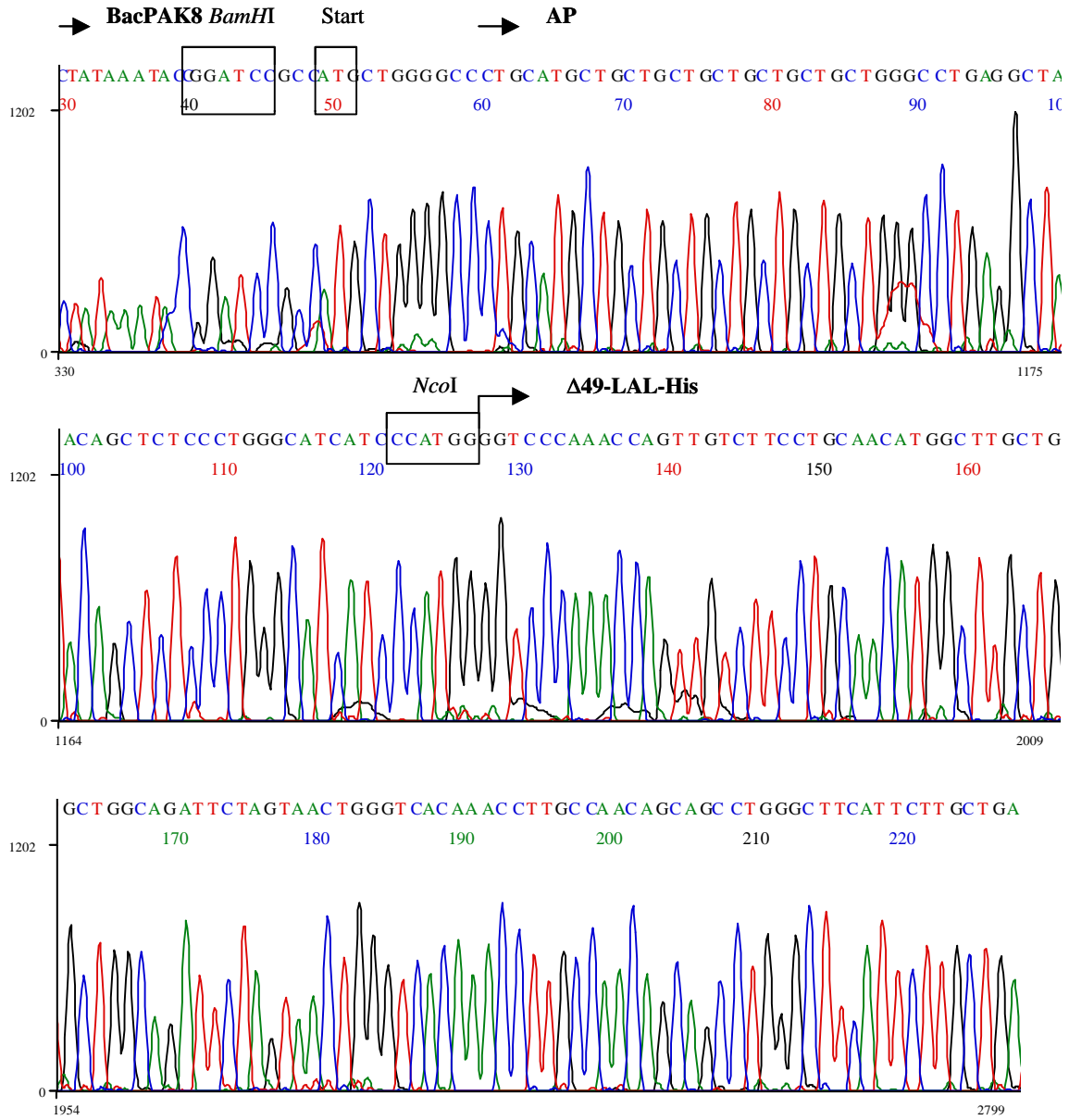
R-Sätze: 34, 50/53

S-Sätze: 26, 36/37/39, 45, 61



Übergang vom Vektor BacPAK8 in die AP Leadersequenz und von der AP Leadersequenz in die LAL

Anhang II



DNA-Sequenz der Δ49-Mutante der LAL-His in BacPAK8

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Detlev Ameis, der mir die Möglichkeit zur praktischen Durchführung meiner Arbeit am Universitätskrankenhaus Eppendorf gab. Seine angenehme Art und stete Diskussionsbereitschaft machten das Labor-Leben leichter.

Bei Herrn Prof. Hans Marquardt bedanke ich mich für die Betreuung von seiten des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg.

Frau Prof. Ulrike Beisiegel danke ich dafür, daß ich auch als assoziierter Wissenschaftler freundlich in die Gemeinschaft ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen wurde und für die Förderung meiner Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt außerdem Frau Dipl.-Biochem. Stefanie (Steffi) Hertel, ohne die ich es nicht geschafft hätte. Ihr Wechsel zur AG Beisiegel war ein großer Verlust.

Ich danke Dr. Peter Friedhoff von der Justus-Liebig-Universität Giessen, der uns bei der Erstellung der 3D-Abbildung der lysosomalen Lipase und der Benutzung des PDB-Viewer-Programms behilflich war.

Frau Dr. Marsha Zeigler (Hadassah-Universität in Jerusalem) hat die LAL-defizienten Wolman-Fibroblastenzellen zur Verfügung gestellt. Vielen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich auch bei Brett Garner, PhD an der University of Oxford, der es zumindest versuchte, Massenspektren der Glykosylierungsmutanten aufzunehmen, jedoch wie andere zuvor an unserem Enzym scheiterte.

Dorte Wendt und David Evans von der AG Beisiegel danke ich für die Hilfe und Unterstützung am Sequenziergerät.

Bei Julia Rethmeier möchte ich mich für die Einweisung in mein Projekt bedanken; bei Christina Bähr und Utz-Florian Hess für ihre Unterstützung in der heißen und hektischen Endphase meiner Arbeit.

Die Arbeit im Labor der medizinischen Klinik hat mir stets viel Freude bereitet. Für die schöne Zeit und vor allem geselligen Donnerstagabende danke ich: Miriam, Britta, Martina, Marion, Kathrin, Sabine, Florian, Dragan, Martin P., Tino, Dennis, Vivienne, Walter und natürlich Edda. Frau Ines Diehl und Herrn Frank Apostel danke ich außerdem für viele nützliche Tips – in jeglicher Hinsicht.

Last but not least möchte ich meiner Mutter danken, die stets ein offenes Ohr für meine Probleme hat.

Lebenslauf

Name: Oliver Zschenker

geboren: 20.04.1970 in Oldenburg

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulen: 1976-1980: Grundschule Alexandersfeld, Oldenburg
1980-1982: Orientierungsstufe, Schulzentrum
Ofenerdiek, Oldenburg
1982-1989: Herbartgymnasium, Oldenburg
Abschluß: Abitur

Studium: 1989-1997: Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
Abschluß: Diplom: 16.08.1996

Stipendium: April 2000-Mai 2001: Promotionsabschlußstipendium
der Universität Hamburg

Grundwehrdienst: Mai 1997-Februar 1998 in Rotenburg/Wümme und
Oldenburg

Arbeit: April 1996-Juli 1996: Studentische Hilfskraft
September 1996-Dezember 1996:
Wissenschaftliche Hilfskraft zur Unterstützung in
Forschung und Lehre bei Frau Priv.-Doz. Dr. Witte,
Universität Oldenburg
Seit 01.06.1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
(Arbeitsgruppe PD Dr. med. D. Ameis)

Abstracts und eigene Veröffentlichungen:

Zschenker, O., S. Hertel, A.-C. Tilkorn, J. Rethmeier and D. Ameis, 1999: N-linked glycosylation of human lysosomal acid lipase. *Biological Chemistry* **380** (Suppl.): 210.

Zschenker, O., S. Hertel, J. Rethmeier and D. Ameis, 2000: Glycosylation mutants of lysosomal acid lipase. *Atherosclerosis* **151**(1): 291.

Zschenker, O., S. Hertel and D. Ameis, 2000: Glycosylation of human acid lysosomal lipase. *Biological Chemistry* **381** (Suppl.): 229.

Eingereicht:

Zschenker, O., S. Hertel, S. Trautwein, N. Jung, J. Rethmeier, M. Zeigler and D. Ameis: Wolman disease due to signal peptide, missense and nonsense mutations in lysosomal acid lipase. *J Lipid Res*

In Vorbereitung:

Zschenker, O., S. Hertel, U.-F. Hess, J. Rethmeier and D. Ameis: Glycosylation of human lysosomal acid lipase.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, alle in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse selbständig erworben und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen zum Verfassen dieser Arbeit genutzt zu haben.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Hamburg, den 7-Mai-01