

## 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 ( $\Delta$ 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  $\Delta$ 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.