

**Evaluierung der Lipidmuster
S-acylierter Proteine
und
Azido-Ceramid Derivate zur
proteomweiten Identifizierung neuer C16-
Ceramid bindender Proteine**



Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund angenommene

Dissertation

von

Janine Schulte-Zweckel, M.Sc.

aus Bottrop

Dekan: Prof. Dr. Roland Winter
1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Leif Dehmelt

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von November 2012 bis Juli 2017 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, sowie mit Dr. Gemma Triola und dem iQAC in Barcelona.

Für Marius

und

Meine Eltern

„Everything is going to be fine in the end.

If it's not fine, it's not the end “

Oscar Wilde

Abstract

Part 01: A Bioorthogonal Probe for Quantitative Profiling of Protein S-Acylation

We have developed a chemical probe that enables the accurate and systematic identification of S-bound fatty acids. The analysis of the S-acylome in different cell lines as well as in an enriched *N*-Ras revealed that proteins are modified with fatty acids of various chain lengths and structures. These previously overlooked fatty acid modifications may have a key role in regulating protein localization and function. Hence, atomic force microscopy studies and FRET-based kinetics assays indicated that the unsaturated *N*-Ras presents an increased tendency toward clustering and higher insertion kinetic rate constants compared to that of its saturated counterpart. The technique could be also applied to investigate the role of CLN3 as a potential fatty acid desaturase. Indeed, overexpression of CLN3 results in all the cases in a significant increase in C16:1 levels. This effect was most marked for *N*-Ras compared to the whole S-acylome, which it may be explained by the substrate specificity of CLN3 or its particular subcellular localization. We are convinced that the developed methodology may strongly contribute to a better understanding of S-acylated proteins.

Part 02: Azido-tagged Sphingolipids for the proteome-wide identification of novel C16-ceramide-binding proteins

To generate a candidate list of ceramide-interacting proteins we applied two methods, a mass spectrometry-based proteomic approach and a proteome microarray. 214 and 127 protein candidates were identified respectively, and 24 were found in both data sets. We initially chose potential candidates for testing on the basis of its potential implication in ceramide-mediated pathways. Binding could be confirmed for: AIFm2, APP, BUD31, Gal-1 and Gal-3, mTOR and PPT1.

The specificity of those proteins for ceramide species with different chain lengths has been also analysed using a pull-down and a competition assay, observing a dose-dependent decrease in the interaction of the lipid with the studied proteins.

To further validate the binding of ceramide to the identified proteins we employed a cellular thermal shift assay. Treatment of cell lysates with C16-Cer resulted in a slighter stabilization of APP, BUD31 and PPT1 and an appreciable increase of melting point temperatures for the other investigated proteins. Finally, the direct interaction of C16-Cer was investigated *in vitro* using a DSF and recombinantly expressed proteins. AIFm2, Bcl-xL, Gal-1 were selected and direct interaction with variable affinities could be proved in all the cases, whereas no binding could be observed when AIFm2 and Gal-1 were titrated with increasing concentrations of palmitic acid, or when C-16-Cer was tested against Son of Sevenless (SOS) protein as a negative control.

Future experiments will be required to elucidate how ceramide binding affects protein activity, if it relies on the modulation of protein localization such as the targeting of LC3B to mitochondria, or if, in turn, it directly regulates protein function such as the activation of the protein phosphatase PP2A.

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeine Einleitung	1
1.1 Definition Lipide	1
1.1.1 Strukturvielfalt.....	2
1.2 Membranen	3
1.2.1 Ein Meer von Lipiden.....	4
1.3 Membranproteine	5
1.3.1 Integrale Membranproteine.....	5
1.3.2 Periphere Membranproteine	6
1.4 Protein-Lipid Interaktionen	6
1.4.1 Lipide und integrale Membranproteine	7
1.4.2 Lipide und membran-assoziierte Proteine	7
1.4.3 Lipide und lösliche Proteine	8
2 Theoretischer Hintergrund	9
2.1 Posttranslationale Modifikationen (PTMs)	9
2.1.1 Die Phosphorylierung	9
2.1.2 Die Glykosylierung	9
2.1.3 Die Ubiquitinierung	10
2.1.4 Die S-Nitrosylierung.....	10
2.1.5 Die Methylierung.....	10
2.1.6 Die N-Acetylierung	10
2.1.7 Die Lipidierung.....	11
2.2 Die S-Palmitoylierung im Detail	12
2.3 Die Ras-Superfamilie	15
3 Zielsetzung der Arbeit	20
4 Ergebnisse und Diskussion	23
4.1 Synthese der Hydroxylamin-Linker	23
4.2 Das Lipid-Extraktions-Protokoll	28
4.3 Analyse des gesamten Zelllysates	32
4.3.1 Validierung der Methode	33
4.4 Immunopräzipitation markierter Ras-Proteine	35
4.4.1 Stabile Transfektionen mit dem Amaxa Nucleofector®	35
4.4.2 Stabile Transfektion von HA-N-Ras und eGFP-N-Ras.....	36
4.4.3 Immunopräzipitation und Lipidextraktion der N-Ras-Varianten.....	37
4.5 Auswirkungen durch APT-Inhibitoren	38
4.5.1 Untersuchung des gesamten Zelllysates	39
4.5.2 Nach Immunopräzipitation.....	40
4.6 Auswirkungen durch SCD1-Inhibition	40
4.6.1 Untersuchung des gesamten Zelllysates	42

4.7 Die Rolle der NCL Proteine in der Zellbiologie.....	42
4.7.1 Die Funktion von CLN3-Proteinen	45
4.8 Stabile Transfektion von mCherry-CLN3 und eGFP-NRas	47
4.8.1 Immunopräzipitation und Analyse	48
4.9 Überprüfung der Palmitoylstelle im CLN3-Protein	51
4.10 Einbau von ¹³C-markierter Palmitoleinsäure.....	52
4.11 Partitionierungsstudien ligierter N-Ras-Proteine	55
4.11.1 Synthese der Fmoc-geschützten Bausteine.....	55
4.11.2 Synthese der Peptidsequenzen	56
4.11.3 MIC-Ligation der lipidierten Peptidsequenzen	57
4.11.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	61
4.11.5 AFM von HD-NRas und HDD-NRas	63
4.11.6 Kinetische Studien	65
5 Zusammenfassung	67
6 Theoretischer Hintergrund	70
6.1 Apoptose	74
6.1.1 Die Rolle von Bax, Bcl-xL und LC3	76
6.2 Protein-Lipid Interaktionen	79
6.2.1 Neue in vitro Methoden	79
6.2.2 Neue in vivo Methoden	80
6.2.3 Bisherige Bemühungen zur Bestimmung neuartiger Protein-Lipid-Wechselwirkungen mit funktionalisierten Lipiden.....	81
6.2.4 Sphingolipid-Protein-Wechselwirkungen und deren Limitierung	83
7 Zielsetzung der Arbeit	86
8 Ergebnisse und Diskussion	87
8.1 Synthese von Azido-Ceramid und Azido-Dihydroceramid.....	87
8.2 Pull-down und Proteomik mit Azido-Ceramid Derivaten	89
8.3 Der Protein Mikroarray (ProtoArray®).....	91
8.3.1 Immobilisierung auf dem Protein Mikroarray („Klick-Chemie“)	92
8.4 Vergleich der Topkandidaten beider Methoden	95
8.5 Validierung der Interaktionspartner	96
8.5.1 Competitions Versuche	97
8.5.2 CETSA (Zellulärer Thermaler Shift-Assay)	99
8.5.3 Das Prinzip der Differentialen Scanning Fluorimetrie	102
9 Zusammenfassung	106
10 Experimenteller Teil.....	108
10.1 Methoden und Messgeräte	108
10.2 Materialien und Geräte der biologischen Experimente	109
10.2.1 Laborgeräte	109
10.2.2 Chemikalien	110
10.2.3 Verbrauchsmaterial	111

10.2.4 Fluorophore.....	113
10.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften und Durchführungen der biologischen Experimente.....	113
10.3.1 Puffer und Lösungen	113
10.3.2 Nährmedien.....	115
10.3.3 Organismen	116
10.3.4 Enzyme	116
10.3.5 Protein- und DNA-Standards	116
10.3.6 Antikörper	116
10.3.7 Reagenzsysteme und biologische Kits	117
10.3.8 Sequenzierungen.....	118
10.3.9 Quantitative PCR	118
10.3.10 Plasmide	118
10.3.11 Isolierte Proteine	119
10.3.12 Programme und Software	119
10.3.13 Inhibitoren.....	120
10.4 Methoden.....	120
10.4.1 Isolierung der RNA.....	120
10.4.2 DNA/ RNA Konzentrationsbestimmung	120
10.4.3 cDNA-Herstellung (Reverse Transkription).....	120
10.4.4 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	120
10.4.5 Transformation in E.Coli-Zellen	121
10.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.Coli.....	121
10.4.7 Glycerol-Kulturen	121
10.4.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	121
10.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	122
10.4.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	122
10.4.11 Kolloidale-Coomassie Färbung	122
10.4.12 Immunoblot, Westernblott	122
10.4.13 Proteindetektion mit LYCOR-gekoppelten Antikörpern	122
10.4.14 Affinitätschromatographie mit DBCO (Pull-down)	123
10.4.15 Affinitätschromatographie mit DBCO (Verdrängung)	123
10.4.16 Tryptischer In-Gel-Verdau	123
10.4.17 Tryptischer On-Bead-Verdau und Stage-Tip.....	123
10.4.18 Protein-Identifizierung mittels nano-HPLC/MS/MS	124
10.4.19 Immobilisierung auf dem Mikroarray.....	125
10.4.20 CETSA (Cellular Thermal Shift Assay).....	125
10.4.21 DSF.....	125
10.5 Zellbiologische Methoden	126

10.5.1 Kryokonservierung der Säugerzellen	126
10.5.2 Bestimmung der Zellzahl	126
10.5.3 Subkultivierung adhärenter Zellen	126
10.5.4 Stabile Transfektion von Zellen	126
10.5.5 Herstellung von Zelllysaten	127
10.5.6 Fixierung von Zellen.....	127
10.5.7 Färbung von Zellen und Zellkompartimenten	127
10.5.8 Färbung von Zellen mit Antikörpern	127
10.5.9 Befestigung von Zellen	128
10.6 Die Lipid-Extraktion (LE)	128
10.6.1 Vortest Cys-Pal Lipid-Extraktion	128
10.6.2 Lipid-Extraktion aus Zelllysaten	128
10.6.3 Inhibierung der Protein Acyl Transferasen (PATs).....	129
10.6.4 Fütterung nicht-natürlicher Fettsäuren.....	129
10.6.5 Immunopräzipitation.....	129
10.6.6 Inhibierung der Acyl Protein Thioesterasen (APT).....	130
10.6.7 Inhibierung der Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1).....	130
10.6.8 C ¹³ Experimente mit Palmitoylsäure-1,2,3,4 ¹³ C ₄	130
10.7 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptidsynthese und die Proteinligation	130
10.7.1 Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes.....	130
10.7.2 Bestimmung der Harzbeladung	131
10.7.3 Testabspaltung vom 2-Chlorotritylharz	131
10.7.4 Abspaltung vom 2-Chlorotritylharz	131
10.7.5 Markierung von N-Ras ($\Delta 1-181$) Wt	131
10.7.6 Ligation N-terminaler, lipidierter Peptide	131
10.8 Synthese der Verbindungen zur Untersuchung von Lipidmustern S-acylierter Proteine	132
10.9 Synthese von Azido-Ceramid-Derivaten für die Evaluierung von Lipid-Protein Interaktionen.....	150
11 Literaturverzeichnis	156
12 Anhang.....	171
13 Danksagung.....	185
14 Curriculum Vitae.....	186
15 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	187

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
eq	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
CML	Chronische myeloische Leukämie
d	Dublett
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
δ	Delta, chemische Verschiebung
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstoß Ionisation
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	<i>Electro spray ionization</i>
Et	Ethyl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ges.	Gesättigt
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
J	Kopplungskonstante
konz.	Konzentriert
m	Multiplett
M	Molar (mol/L)
m/z	Masse/Ladung
Me	Methyl
n	Normal
NMR	Nuklear-Magnet-Resonanzspektroskopie
PP1	Proteinphosphatase 1
PPT1	Protein-Palmitoylthioesterase 1
q	Quartett
R	Rest
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>Ribonucleic acid interference</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rf	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

1 Allgemeine Einleitung

Lipide gehören zu einer Klasse von Biomolekülen, welche für eine lange Zeit im Schatten des laufenden Omik-Trends der Biologie standen. Die wissenschaftliche Gemeinschaft konzentrierte sich zu sehr auf DNA, RNA und Proteine, da sie sich durch diese Studien eine Verknüpfung zum mechanistischen Verständnis von Zell-Funktion und Homöostase versprachen. Besonders der Fortschritt bei der Sequenzierung und der Annotation des Genoms sowie dem schnellen Wachstum von Datenbanken sorgte für die naive Vorstellung, dass die Identifizierung eines bestimmten Proteins in einem gegebenen biologischen Kontext ausreichend sei, um die komplexen Abläufe von Organismen zu verstehen. In dieser Zeit wurden die Lipide in erster Linie nur als heterogene Gruppe von Molekülen mit wenigen spezifischen Funktionen angesehen.¹

1.1 Definition Lipide

Lipide, die Grundkomponenten biologischer Membranen, bilden strukturell und funktionell eine vielfältige Gruppe von Stoffwechselprodukten. Sie spielen wichtige Rollen in biologischen Systemen: einschließlich der Bildung der Membran-Doppelschicht, der Energiespeicherung, der Signaltransduktion, sowie der Herstellung und Bereitstellung von Membranproteinen und deren Wechselwirkungen.² Der Hauptunterschied zwischen Lipiden und Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren ist deren Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Historisch gesehen sind Lipide entweder durch ihre physikalischen Eigenschaften definiert, und zwar der Löslichkeit in nicht-polaren Lösungsmitteln, oder durch ihren Aufbau aus langen Kohlenwasserstoffketten. Allerdings können nicht alle Lipide diese beiden Anforderungen erfüllen.³ Aus diesem Grunde haben Forscher versucht bestehende Definitionen zu verfeinern. Sie erschufen ein neues Nomenklatur-System für Lipide auf Basis der Lipid-Biosynthese. Darin definieren Sie Lipide als "hydrophobe oder amphipathische kleine Moleküle, die vollständig oder teilweise aus der Carbanion-basierten Kondensation von Thioestern und/ oder durch die Carbokation-basierte Kondensation von Isopren-Einheiten" entstehen.⁴ Lipide lassen sich in diesem System in acht Hauptkategorien unterteilen: Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterollipide, Prenollipide, Saccharolipide und Polyketide.

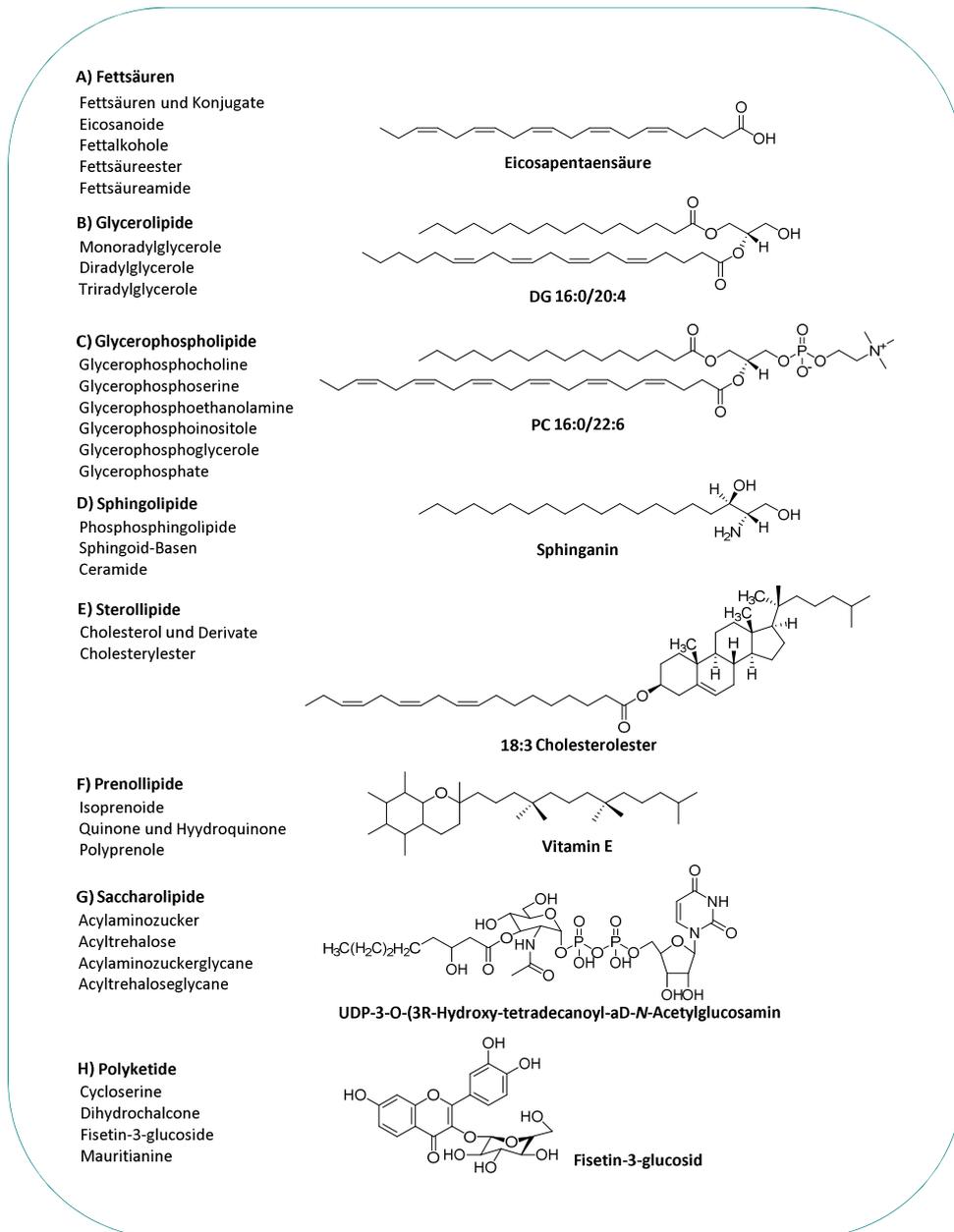


Abbildung 1: Geläufige Lipidklassen und repräsentative Vertreter der jeweiligen Lipidmolekülspezies. (A) Fettsäuren: Eicosapentaensäure; (B) Glycerolipide: DG 16:0/ 20:4; (C) Glycerophospholipide: PC 16:0/22:6; (D) Sphingolipide: Sphinganin; (E) Sterollipide: 18:3 Cholesterinester; (F) Prenollipide: Vitamin E; (G) Saccharolipide: UDP-3-O- (3R-hydroxy-tetradecanoyl) - α D-N-Acetylglucosamin; (H) Polyketide: Fisetin-3-glucosid.⁴

Aber auch in diesem System umfassen Lipide immer noch eine breite Palette von molekularen Strukturen.

1.1.1 Strukturvielfalt

Lipide sind chemisch betrachtet bei Weitem die größte diverse Klasse von Biomolekülen. Eine durchschnittliche eukaryotische Zelle umfasst etwa 1300-1500 verschiedene Arten von Lipiden. Zusätzlich haben verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Leber- und Gehirnzellen, neben unterschiedlichen zellulären Organellen auch unterschiedliche Lipid-Zusammensetzungen. Inzwischen gibt es umfangreiche Bemühungen, die Kompositionsmuster von Lipiden an die physiologischen Zustände von Zellen zu korrelieren und das Zellverhalten vom Standpunkt der sogenannten Lipidomik her anzunähern.⁵ Diese strukturelle Vielfalt und die Anzahl an Genen, die erforderlich sind, um diese

Variabilität zu ermöglichen, lassen vermuten, dass die hohe Diversität von Lipiden für die Zelle enorm wichtig ist und dass die Entschlüsselung dieser Komplexität Wissenschaftler vor große Aufgaben stellt.

1.2 Membranen

Membranen bilden einen Treffpunkt für Lipide und Proteine. Sie werden durch eine Matrix aus Lipiden gebildet, deren Struktur und Zusammensetzung alles andere als trivial ist. Die Anzahl der verschiedenen Lipidmoleküle in der Plasmamembran einer Zelle kann 1000 Varianten weit überschreiten. Zudem zeigt die hohe Anzahl von Strukturen, die durch Lipide bereits *in vitro* geformt werden können, dass die strukturellen Eigenschaften von Membranen ebenfalls *in vivo* stark variieren können. Phospholipide, wie zum Beispiel Phosphatidylcholin (PC), weisen eine zylindrische molekulare Form auf und sie neigen dazu mit anderen zylinderartigen Phospholipiden zu assoziieren, um planare Strukturen zu formen.⁶ Kegelförmige Lipide mit sperrigen polaren Köpfen, wie Lysophosphatidylcholin (LPC) oder auch gekürzte, kegelförmige Lipide mit kleinen Kopfgruppen, wie Phosphatidylethanolamin (PE), können sphärische Mizellen oder auch röhrenförmige Strukturen mit positiver oder negativer Krümmung bilden. Darüber hinaus können Lipide nicht nur verschiedene Phasen unter verschiedenen Bedingungen aufweisen (Lipid-Mesomorphismus), sie können auch endliche Strukturen innerhalb von Zellmembranen ausbilden (Membranmikrodomänen). Insgesamt scheinen die spezifischen Arten von Lipidspezies und deren Niveaus in Membranen hervorragend geregelt zu werden. Dabei entstehen allgemeine Muster, die mit der Art der untersuchten Zelle und Organellen verbunden sind. Jeder Membrantyp ist somit hoch spezialisiert und die verschiedenen Attribute werden durch spezifische Membranproteine und Lipide bestimmt. Das heißt also, dass eine gegebene Membran eine stabile und bestimmte Lipidzusammensetzung besitzt, und obwohl es viele Kombinationsmöglichkeiten von Lipidtypen und Proportionen gibt, treten Änderungen in der Zusammensetzung nur unter bestimmten pathologischen oder physiologischen Situationen auf. Die große Vielzahl an Lipidzusammensetzungen (Tabelle 1) und deren Unterschiede in den verschiedenen Membrantypen haben wichtige Auswirkungen auf die Lipid-Organisation in der Membran.⁷ Im externen Bereich der Plasmamembran sowie im lumenalen Bereich der internen Organellen befinden sich hohe Konzentrationen an Cholin-haltigen Lipiden, wie PC und Sphingomyelin (SM). Dagegen ist der Cytoplasma-Bereich (Protoplasma) reich an Amin-haltigen Glycerophospholipiden, wie PE und Phosphatidylserin (PS). Andere kleine Phospholipide, wie Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-Monophosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat (PIP2) lassen sich vor allem auf der zytoplasmatischen Seite der Membran finden, wo sie an der Signalweiterleitung und Verarbeitung der Zellen mitwirken.^{8,9}

Tabelle 1: Lipidzusammensetzung verschiedener Membrantypen.⁷

Membrantypen	Prozente an Phospholipiden							Cholesterol [µg/mG-Protein]
	PC	PE	PS	PI	PA	CL	SM	
Plasmamembran	39	23	9	8	1	1	16	128
Mitochondria	40	35	1	5	-	18	1	3
Mikrosom	58	22	2	10	1	1	1	14
Lysosom	40	14	2	5	1	1	20	38
Kernmembran	55	13	3	10	2	4	3	38
Golgi-Membran	50	20	6	12	< 1	1	8	78
Sarkoplasmatisches Retikulum	72.7	13.5	1.8	8.7	< 1	< 1	1	12

Interessanterweise zeigt die Membran des endoplasmatischen Retikulums eine symmetrische Lipidverteilung und enthält in erster Linie ungesättigte Glycerolipide, die eine hohe Flexibilität bieten und die Einarbeitung von neu synthetisierten Proteinen erleichtern.¹⁰

1.2.1 Ein Meer von Lipiden

Die klassische biologische Membran basiert auf dem Singer-Nicholson Mosaik-Fluidmodell in dem angenommen wurde, dass die Lipid-Doppelschicht das strukturelle Rückgrat der Membran bildet.¹¹ Diese Doppelschicht ist dabei aus niedrig dielektrischen Kohlenwasserstoffketten mit ihren polaren Kopfgruppen aufgebaut und verhält sich wie eine starre Platte, die an beiden Seiten dem flüssigen Medium der Zelle ausgesetzt ist (Abbildung 2). Das Flüssig-Mosaik-Modell sagt aus, dass Membranen durch eine fluide Doppelschicht gebildet werden in der sich Proteine und Lipide frei bewegen.^{12,13} Man sprach von einem „Meer von Lipiden“.

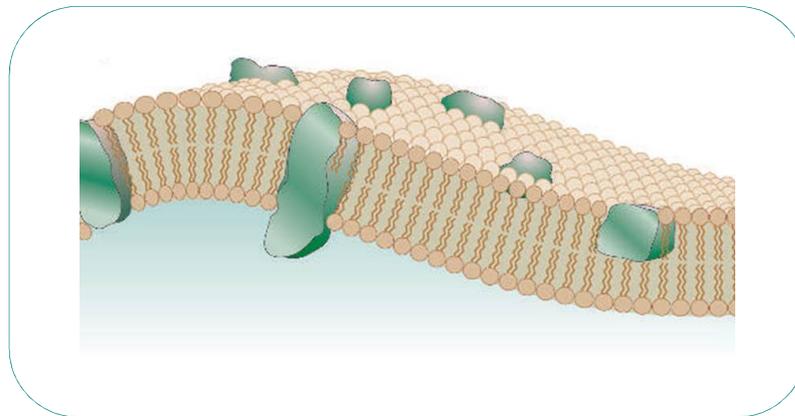


Abbildung 2: Schematische Illustration einer Biomembran nach Singer und Nicholson (Flüssig-Mosaik-Modell).¹²

In den letzten Jahren wurde dieses eher starre Modell durch neue Konzepte erweitert. Das sogenannte erweiterte Flüssig-Mosaik-Modell sieht zusätzliche Struktur- und Funktionseigenschaften der Membran-Organisation vor.¹³ Zu diesen gehören: Lipidmischungen, die Lipid-Heterogenität, Lipidflöße, lokale Krümmungen und Protein-Lipid-Wechselwirkungen (Abbildung 3). Die Heterogenität der Membranen wird weiter durch laterale Asymmetrien erreicht, indem Membran-Regionen (basal, lateral, apikal) und andere spezialisierte Membranbereiche oder Mikrodomänen (Lipidflöße, Caveolae, Synaptosomen, etc.)¹⁴ mit in die ursprüngliche mosaikartige Struktur der Membranen einfließen.

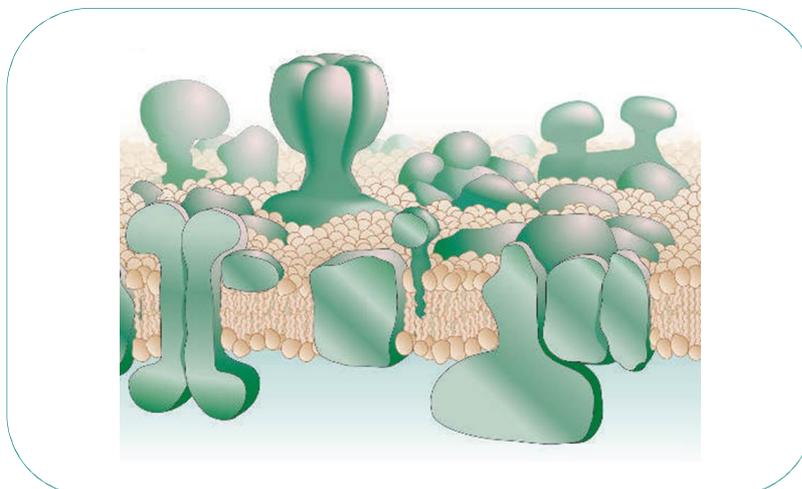


Abbildung 3: Schematische Illustration einer Biomembran nach der Erweiterung des Flüssig-Mosaik-Modells.¹²

Die Bildung dieser Domänen ergibt sich zum Teil aus der nicht idealen Vermischung von in Membranen befindlichen Lipiden und in einigen Fällen werden sie durch die Teilnahme spezieller Zytoskelett Strukturen unterstützt, die die Lipiddoppelschicht stützen und den Verkehr von Proteinen und Lipiden beschränken. Zusätzlich besitzen Zellen komplexe Mechanismen, um die spezifische Lipidzusammensetzung von Membran zu steuern. Dazu gehören spezialisierte Enzyme wie Flippasen, Floppasen und Skramblasen, die für die Beibehaltung dieser präzisen Membranlipid-Verteilung verantwortlich sind.^{14,15} Tatsächlich ist die heterogene Verteilung von Lipiden entscheidend für die korrekte physiologische Homöostase der Zellen.

Die Organisation der bestimmten Domänen ist ein wichtiger Aspekt der Membran-Struktur, die vor kurzem zunehmende Aufmerksamkeit erhielt. Weil Lipide eine signifikante laterale Beweglichkeit aufweisen, könnte man erwarten, dass sie in den meisten Membranen homogen verteilt wären. Doch sowohl Modelle als auch biologische Membranen zeigen ein nicht ideales Mischungsverhältnis in Systemen mit zwei oder mehreren Elementen.^{15,16} Obwohl verschiedene Domänen bereits bekannt sind, konzentriert sich die Forschung seit vielen Jahren auf die sogenannten Lipidflöße. Aus praktischer Sicht lässt sich ein Lipidfloß als eine einzelne Detergenzien unlösliche glycolipidreiche (DIG) Membranfraktion definieren, die einen hohen Gehalt an Cholesterin, Glycosphingolipide, SM und Proteinen aufweist. Die Thematik der Lipidflöße wird immer noch stark kontrovers diskutiert, obwohl Fluoreszenz-Resonanz-Studien bereits Flöße mit einem mittleren Durchmesser zwischen 30 bis 50 nm¹⁷ und mehreren hundert Mikrometern¹⁸ zeigen konnten.

1.3 Membranproteine

Biologische Membranen haben eine Phospholipid-Doppelschichtstruktur, die einen Satz von Proteinen enthält, die der Plasmamembran helfen ihre charakteristischen Funktionen zu tragen. Diese Membranproteine können an der Membran befestigt oder der Membran einer Zelle oder einer Organelle zugeordnet sein. Membranproteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden, basierend auf der Stärke ihrer Assoziation mit der Membran: Einige Membranproteine sind an die Lipiddoppelschicht gebunden und sind in der Regel an Zellzellsignalisierung oder Wechselwirkungen beteiligt (periphere Membranproteine). Andere sind innerhalb der Lipid-Doppelschicht einer Zelle eingebettet, bilden oft Kanäle und Poren (integrale Membranproteine). Membranproteine können sowohl an der Außenseite als auch an der Innenseite der Zellmembran angebracht werden und Proteine können auf verschiedene Arten an die Zellmembran gebunden werden.¹⁹

1.3.1 Integrale Membranproteine

Integrale Proteine (auch: intrinsische Proteine) sind Proteine, die sich durch eine starke Wechselwirkung mit der Membran auszeichnen, die nur durch Zugabe von Detergenzien oder einem anderen unpolaren Lösungsmittel gebrochen werden kann. Im Wesentlichen sind sie dauerhaft an die Membran gebunden. Sie können sich über die gesamte Phospholipid-Doppelschicht erstrecken (transmembran) oder monotopen sein. Sie haben ein oder mehrere Segmente, die permanent in die Phospholipid-Doppelschicht eingebettet sind und ihre Domänen auf beiden Seiten der Membran haben. Die meisten integralen Proteine enthalten Reste mit hydrophoben Seitenketten, die mit Fettsäureacylgruppen der Membranphospholipide in Wechselwirkung treten und so das Protein an die Membran verankern. Die meisten integralen Proteine überspannen die gesamte Phospholipid-Doppelschicht, wie Rezeptoren und Ionenkanäle.¹⁹

Transmembranproteine gehören zu den häufigsten Proteinen unter den integralen Proteinen. Sie können aus α -Helices oder β -Strängen oder aus einer Kombination von beiden aufgebaut sein. Membranüberspannende α -Helices sind das häufigste Strukturmotiv dieser Proteine. Eines der ersten gefundenen α -Proteine war das Bakteriorhodopsin, das mit sieben α -Helices die Membran durchspannt. Aber auch spannungsgesteuerte Ionenkanäle wie Kalium- und Chloridkanäle sind Beispiele für α -helicale Transmembranproteine. Membranproteine können aber auch aus β -Strängen aufgebaut sein. Dies ist der Fall bei Kanalproteinen, welche durch die Anordnung von β -Strängen gebildet werden. Dabei ist jeder Strang in einer antiparallelen Anordnung an seinen Nachbarn gebunden und bildet ein einziges β -Faltblatt. Dieses Faltblatt kräuselt sich schließlich, um einen Hohlzylinder zu bilden, der einen Kanal in der Membran bildet. Ein Beispiel hierfür ist das Kanalprotein Porin, welches gänzlich aus β -Strängen aufgebaut ist. Ferner können Transmembranproteine in Typ I und Typ II Proteine eingestuft werden. Sie unterscheiden sich in der Position ihres C- bzw. N-Terminus. Bei Typ I Proteinen befindet sich der N-Terminus auf der Außenseite der Membran, wohingegen Typ II Proteine ihren C-Terminus auf der Außenseite der Membran haben.²⁰

1.3.2 Periphere Membranproteine

Periphere Proteine (auch: extrinsische Proteine) sind Proteine, die eine viel schwächere Wechselwirkung mit der Membran haben als integrale Proteine. Die Dissoziation von peripheren Proteinen kann bereits durch Behandlung von Lösungen mit hohem pH-Wert oder hohen Salzkonzentrationen erreicht werden. Sie werden vorübergehend an die Lipiddoppelschicht oder an integrale Proteine durch hydrophobe, elektrostatische und andere nicht-kovalente Wechselwirkungen gebunden. Typischerweise erfolgt diese Anbindung entweder indirekt über die Interaktion mit integralen Proteinen oder direkt durch Wechselwirkung mit den polaren Köpfen des Phospholipids (amphitrop) an die Membran. Einige periphere Proteine zeigen beide Arten von Wechselwirkungen. Dazu gehören bestimmte Kinasen und G-Proteine. Sowohl Ras (eine GTPase) als auch Src (eine Proteintyrosinkinase) sind Proteine, die sich an Signaltransduktionswegen beteiligen, aber bei kovalenter Bindung einer Lipidgruppe werden sie an die Innenseite der zytoplasmatischen Membran gebunden. Wenn Ras und Src an der Zellmembran befestigt sind, sind sie besser in der Lage, Informationen zu empfangen und zu übertragen, die über ihre jeweiligen Signaltransduktionswege übertragen werden.

1.4 Protein-Lipid Interaktionen

Lipide funktionieren überwiegend durch ihre Wechselwirkungen mit Proteinen. In der Tat sind Protein-Lipid-Wechselwirkungen an allen biologischen Prozessen beteiligt und sind von größter Bedeutung für die pharmazeutische Entdeckung, da sich 60% der Arzneimittelanriffspunkte an der Zelloberfläche oder in anderen Zellmembranen befinden.²¹ Integrale und periphere Membranproteine machen dabei ein Drittel des vollen Proteoms aus.²² Wie bereits erwähnt sind Lipide bekannt für ihre amphipathische Natur und ihre Fähigkeit Membran-Doppelschichten zu bilden. Ihre Strukturen sind vielfältig wegen ihrer unterschiedlichen chemischen Rückgrate und die Kombination der verschiedenen metabolischen Bausteine führt zu einer vielfältigen Lipidlandschaft, die von Proteinen weitgehend ausgenutzt wird.²³ Proteine haben selbst eine Vielzahl von Motiven und Domänen, die einzelne Lipide und/ oder sogar allgemeinere Membraneigenschaften wie Krümmung, Dicke oder spezialisierte Mikrodomänen erkennen und binden können.²³ Allgemein lassen sich die Protein-Lipid-Wechselwirkungen in drei Kategorien unterteilen, je nach Mechanismus, durch den diese Moleküle sich gegenseitig erkennen und die Umgebung, in der sie gefunden werden.²³

1.4.1 Lipide und integrale Membranproteine

Eine wesentliche Art der Protein-Lipid-Wechselwirkung umfasst integrale Membranproteine, die mit spezifischen Lipiden innerhalb der hydrophoben Ebene der Membran wechselwirken. Diese Art von Interaktion ist an der Ausrichtung von Proteinen an spezifische Organellen beteiligt²⁴ und kann zur Modulation von Proteinstruktur, Aktivität und Funktion verwendet werden.^{25,26} So zeigte sich bei der Untersuchung einer Transmembrandomäne (TMD) eine direkte und hochspezifische Wechselwirkung von ausschließlich einer Sphingomyelin Art, dem SM 18 zu der COPI Maschine des Proteins p24.²⁷ Dabei hängt die Interaktion sowohl mit der Kopfgruppe als auch mit dem Rückgrat des Sphingolipides zusammen, sowie mit der Signatur-Sequenz (VXXTLXXIY) innerhalb der TMD. Durch diese Interaktion scheint das SM 18 das Gleichgewicht zwischen einer inaktiven monomeren und einer aktiven oligomeren Form des p24 Proteins zu regeln. Diese Schalterfunktion regelt wiederum den COPI-abhängigen Transport innerhalb des Organismus.²⁷ Diese Entdeckung einer beispiellosen Spezifität innerhalb einer Wechselwirkung einer TMD mit einem individuellen Sphingolipid zeigt, warum biologische Membranen aus einer solchen Vielzahl von verschiedensten Lipiden zusammengebaut werden. Lipide und integrale Membranproteine haben zusätzlich eine wichtige Rolle in Fusions- und Spaltungsprozessen, sowie bei der Formation von Vesikeln, die entscheidend für zahlreiche Transportprozesse in Organismen sind. Die Mechanismen der Vesikelfusion sind allgegenwärtig in der Zellbiologie und Neurowissenschaft. SNAREs (lösliche N-Ethylmaleimid-sensitive Faktor Verknüpfungs-Protein-Rezeptoren) und ihre assoziierten Proteine beispielsweise spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung dieser Neurotransmitter-Vesikel-Fusionen. Der SNARE-Komplex überbrückt Vesikel mit der Plasmamembran während der regulierten Exozytose und besteht aus drei definierten Proteinen: dem Plasmamembranankerprotein Syntaxin, dem zytoplasmatischen synaptosomal-assoziierten Protein SNAP-25, das mit Membranen durch Palmitoylierung wechselwirkt und dem Vesikel-assoziierten Membranprotein 2 (VAMP-2) bzw. Synaptobrevin (syb2). Der detaillierte Mechanismus der regulierten Exozytose ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber die aktuelle Hypothese ist, dass der SNARE Komplex bei der eigentlichen Fusion beteiligt ist und die intrinsische Fähigkeit besitzt die Membranfusion durchzuführen.^{28,29}

1.4.2 Lipide und membran-assoziierte Proteine

Eine weitere wichtige Art von Interaktion beinhaltet die Rekrutierung von löslichen Proteinen an die Zellperipherie von biologischen Membranen. Mehrere Domänen erkennen spezifische Lipidkopfgruppen³⁰ (z.B. erkennen Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen Phosphoinositidphosphate und die C2-Domäne von Lactadherin erkennt Phosphatidylserin) und/ oder spezifische Membranmerkmale (z.B. Epsin-Amino-terminale Homologie (ENTH) und BAR-Domänen Erkennung der Membrankrümmung).³⁰⁻³² Wie integrale Proteine, können auch periphere Proteine die Membranzusammensetzung und Struktur regulieren und viele dieser Proteine unterliegen Co- oder posttranslationalen Modifikationen, die beispielsweise das Hinzufügen oder Entfernen von Fettsäuren oder Isoprenoid-Einheiten umfassen. Ein sehr effektives Beispiel für eine vorübergehende Vereinigung zwischen Membranproteinen und Lipiden zeigt die Familie der Ras-Proteine (Details Abschnitt 2.3). Der dynamische Zyklus der Palmitoylierung und De-Palmitoylierung erlaubt den kleinen GTPasen H-Ras und N-Ras zwischen ihren Interaktionsorten, dem Golgi-Kompartiment und der Plasmamembran, zu wandern. So können sie sich in ihrem depalmitoylierten Zustand schnell auf und abseits der Zytosolischen Seite der ER-/ Golgi-Membranen bewegen und durch die Palmitoylierung eines oder mehrerer Cysteine in der Plasmamembran verankern, um mit ihren Interaktionspartnern zu agieren und/ oder Signalkaskaden zu aktivieren/ regulieren.^{33,34} Ein anderes Beispiel bietet das aus der

Autophagie bekannte LC3 Protein. So zeigte sich, dass dessen Lipidierung die Struktur und vor allem die Krümmung der Membran des Autophagosoms deutlich beeinflusst, wenn nicht gar reguliert. Im Zuge der Makroautophagie wird Material durch die Bildung des Autophagosoms in die Lysosomen transportiert und abgebaut. Während der Bildung des Autophagosoms interagieren mehr als 30 einzigartige Proteine in einer zeitlich definierten Art und Weise mit der autophagosomalen Membran. Zu den endgültigen Autophagosom-spezifischen Proteinen gehören die Atg8-Familie von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen, die in Säugetieren aus den LC3-, GATE-16- und GABARAP-Unterfamilien besteht. Die Atg8/ LC3-Membranassoziation wird durch die kovalente Bindung von Atg8/ LC3 zu Phosphatidylethanolamin (PE) vermittelt. Erst durch die sich ergebende Lipidierung können die Reifungsschritte des Autophagosoms weiter voran schreiten.³⁵ Aktuelle Studien zeigen, dass diese Lipidmodifikationen und die umliegende Aminosäuren nicht nur an der Interaktion mit Membranen beteiligt sind, sondern dass sie auch die Membranlipid-Struktur, die Bildung von Lipiddomänen in Membranen und das Clustering von G-Protein Peptiden regulieren.^{36,37} So fungieren Lipide und andere Membranattribute als Botenstoffe, um die räumlich-zeitliche Rekrutierung und Aktivierung spezifischer Proteineffektoren zu kontrollieren.³² Ein wichtiges Beispiel ist die Ser/ Thr-Kinase AKT1, die durch ihre Rekrutierung auf Membranen durch ihre spezialisierte PH-Domäne aktiviert wird.³²

1.4.3 Lipide und lösliche Proteine

Die dritte und meist übersehene Art der Lipid-Protein-Wechselwirkung beinhaltet lösliche Proteine, die Lipide außerhalb von Zellmembranen binden. Diese Proteine binden Lipide in einer hydrophoben Tasche und fungieren als Transporter, Lipid-Chaperone (z.B. Lipide zu metabolischen Enzymen) und/ oder Signalisierungsfaktoren.^{38,39} Zwei übergeordnete Beispiele sind Lipid-Transfer-Proteine, die verschiedene Lipide zwischen verschiedenen Organellen durch einen nicht-vesikulären Transfermechanismus⁴⁰ und nukleare Rezeptoren transportieren.⁴¹ Ein bekannter Vertreter der Lipidtransportproteine ist das Protein CERT. Es transportiert synthetisiertes Ceramid aus dem ER zum Golgi, wo dieses weiter als Substrat für die Sphingomyelin (SM) Synthese genutzt werden kann.⁴²

Die drei verschiedenen Arten von Protein-Lipid-Wechselwirkungen schließen sich nicht gegenseitig aus. Oft kann das gleiche Protein gleichzeitig durch verschiedene Mechanismen auf unterschiedliche Membranen oder Lipide eingehen und binden. Das schafft molekulare Komplexität und Vielfalt. Offensichtlich engagieren sich Proteine und Lipide in pleiotropen und facettenreichen Beziehungen, die auf verschiedenen biophysikalischen Prinzipien basieren und traditionell von verschiedenen wissenschaftlichen Gemeinschaften untersucht werden. Viele menschliche Erkrankungen, einschließlich metabolischer, immunologischer sowie Störungen des Zentralnervensystems und Krebs sind die Folge einer Veränderung im Lipidstoffwechsel von Enzymen und ihrer Signalwege.⁴³ Jedoch ist der Beitrag der Lipide zu zellulärer Transformation, Tumor-Entwicklung und Tumorprogression, sowie ihre mögliche Rolle bei der Ausbreitung von Krebszellen zu sekundären Standorten noch nicht vollständig verstanden.⁴⁴ Die Entwicklung analytischer Tools, die eine solche Vielfalt von Molekülstrukturen entschlüsseln könnte, ist ein wesentlicher Schritt, um die Lipidomik aus dem Schatten der Genomik, Proteomik und Metabolomik zu lösen und aufkommende Erkrankungen, wie Diabetes, Adipositas, Arteriosklerose, koronare Herzerkrankung, Hirnverletzungen und nicht zu vergessen Krebsarten zu verstehen oder sogar zu heilen.³



Teil 01:
Evaluierung der Lipidmuster
S-acylierter Proteine

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Posttranslationale Modifikationen (PTMs)

In den letzten Jahrzehnten haben Wissenschaftler entdeckt, dass das menschliche Proteom weitaus komplexer als das menschliche Genom ist. Während das menschliche Genom ungefähr 20.000-25.000 Gene aufweist, wird die Gesamtzahl der Proteine im menschlichen Proteom auf über eine Millionen geschätzt.^{45,46} Diese Schätzungen zeigen, dass einzelne Gene mehrere Proteine kodieren. Diese enorme Zahl kann durch Mechanismen wie die Genomische-Rekombination, die Initiation der Transkription bei alternativen Promotoren oder die differentiale Transkriptionstermination sowie durch das alternative Spleißen des Transkripts erklärt werden, die verschiedene mRNA-Transkripte von einem einzigen Gen erzeugen können.⁴⁷ Eine weitere Erhöhung dieser Komplexität wird durch die sogenannten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) erreicht. PTMs sind chemische Modifikationen, die eine Schlüsselrolle in der funktionellen Proteomik spielen, weil sie die Aktivität, Lokalisierung und Wechselwirkung mit anderen zellulären Molekülen wie Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden und Co-Faktoren regulieren. Sie erhöhen die Funktionsvielfalt des Proteoms durch die kovalente Addition von funktionellen Gruppen oder auch Proteinen. Diese Änderungen umfassen Prozesse der Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung, Nitrosylierung, Methylierung, Acetylierung sowie Lipidierung und beeinflussen fast alle Aspekte der normalen Zellbiologie und Pathogenese. Das menschliche Proteom ist sehr dynamisch und kann durch die posttranslationalen Modifikationen seine Antworten auf Stimuli regulieren und die zelluläre Aktivität steuern. Insgesamt können die PTMs an unterschiedlichen Aminosäureseitenketten oder auch Peptidbindungen selbst auftreten. Dabei werden sie meist durch eine enzymatische Aktivität vermittelt. Tatsächlich wird geschätzt, dass 5% der Enzyme mehr als 200 Arten von posttranslationalen Modifikationen durchführen.⁴⁸ Zu diesen Enzymen gehören die Klasse der Kinasen, Phosphatasen, Transferasen und Ligasen, die jeweils das Hinzufügen oder Entfernen von funktionellen Gruppen, Proteinen, Lipiden oder Zuckern zu oder von Aminosäureseitenketten regulieren. Allgemein kann eine PTM in jedem Schritt des Lebenszyklus eines Proteins auftreten. Viele Proteine werden direkt nach ihrer Translation modifiziert, dabei soll zum einen die richtige Proteinfaltung vermittelt, aber auch eine gewisse Stabilität des Proteins gewährleistet werden. Insbesondere wenn die naszierenden Proteine zu unterschiedlichen zellulären Kompartimenten (z.B. Kern, Membran) geleitet werden müssen. Andere Modifikationen treten erst nach dem Falten und der Lokalisierung der Proteine auf, um deren katalytische Aktivität zu aktivieren oder zu deaktivieren oder um die biologische Aktivität des Proteins auf eine andere Art und Weise zu beeinflussen.⁴⁸

2.1.1 Die Phosphorylierung

Die reversible Protein-Phosphorylierung, die hauptsächlich an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten stattfindet, ist eine der wichtigsten und gut untersuchtesten posttranslationalen Modifikationen. Die Phosphorylierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von vielen zellulären Prozessen einschließlich Zellzyklus, Wachstum, Apoptose und innerhalb von Signaltransduktionswegen.⁴⁸

2.1.2 Die Glykosylierung

Die Glykosylierung von Proteinen ist ebenfalls eine wichtige posttranslationale Modifikation. Sie hat erhebliche Auswirkungen auf die Proteinfaltung, Konformation, Verteilung, Stabilität und Aktivität von Proteinen. Die Glykosylierung umfasst eine vielfältige Auswahl an Zucker-Einheiten die als Ergänzungen für die Proteine dienen. Davon eingeschlossen sind sowohl einfachen Monosaccharide,

die eine Änderungen der Kerntranskriptionsfaktoren erreichen können, bis hin zu hochkomplexen verzweigten Polysacchariden, die eine Veränderungen von Zelloberflächenrezeptoren ermöglichen. Zu den wichtigsten Vertretern zählen hier Kohlenhydrate, die in Form von Asparagin-gebundenen (*N*-gebunden) oder Serin-/ Threonin-verknüpften (*O*-gebundenen) Oligosacchariden als Strukturkomponenten an vielen Zelloberflächen und sekretierten Proteinen gebunden werden.⁴⁸

2.1.3 Die Ubiquitinierung

Ubiquitin ist ein 8 kDa großes Polypeptid bestehend aus 76 Aminosäuren, das an die Aminogruppe des Lysins im Zielprotein über das C-terminale Glycin des Ubiquitin angehängt wird. Nach ihrer Modifikation mit Ubiquitin werden die polyubiquitinierten Proteine durch das 26S-Proteasom erkannt und abgebaut.⁴⁸

2.1.4 Die S-Nitrosylierung

Stickstoffmonoxid (NO) wird von drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) produziert und ist ein chemischer Botenstoff, der mit freien Cysteinresten reagiert, um S-Nitrothiole (SNOs) zu bilden. Die S-Nitrosylierung ist eine reversible PTM, die von Zellen verwendet wird, um Proteine zu stabilisieren, die Genexpression zu regulieren und NO-Donatoren zu liefern. Zusätzlich ist sie für die Erzeugung, Lokalisierung, Aktivierung und den Katabolismus von SNOs verantwortlich.⁴⁸

2.1.5 Die Methylierung

Der Transfer von Ein-Kohlenstoff-Methylgruppen an Stickstoff oder Sauerstoff (*N*- und *O*-Methylierung) zu Aminosäureseitenketten steigert die Hydrophobizität des Proteins und kann eine negative Aminosäure-Ladung neutralisieren, wenn sie an einer Carbonsäure gebunden ist. Die Methylierung wird durch Methyltransferasen vermittelt, und *S*-Adenosylmethionin (SAM) ist der primäre Methylgruppendonator. Während die *N*-Methylierung definitiv rückgängig gemacht werden kann, ist die Reversibilität der *O*-Methylierung noch nicht geklärt, wobei sie als möglich erachtet wird. Insgesamt ist die Methylierung ein bekannter Mechanismus innerhalb der epigenetischen Regulation. Die Histon-Methylierung und auch De-Methylierung können die Verfügbarkeit von DNA für die Transkription beeinflussen. Aber auch Aminosäurereste können mit einer einzelnen Methylgruppe oder auch mehreren Methylgruppen konjugiert werden, um die Auswirkungen der Änderung noch weiter zu erhöhen.⁴⁸

2.1.6 Die N-Acetylierung

Die *N*-Acetylierung, die Übertragung einer Acetylgruppe an einem Stickstoff, findet in fast allen eukaryotischen Proteinen sowohl durch irreversible als auch reversible Mechanismen statt. Der Prozess der co-translationalen Acetylierung erfordert zuerst die Spaltung des *N*-terminalen Methionins durch die Methioninaminopeptidase (MAP), bevor die Aminosäure der wachsenden Polypeptidketten mit einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA durch die *N*-Acetyltransferase (NAT) modifiziert werden kann. Dabei ist das Protein immer noch mit dem Ribosom verknüpft. Während 80-90% der eukaryotischen Proteine auf diese Weise acetyliert werden, ist die genaue biologische Bedeutung bisher noch unklar.⁴⁸ Eine weitere wichtige Acetylierung ist die Lysin-Acetylierung, die an der ϵ -NH₂-Gruppe von Lysinen an dem Histon-*N*-Terminus stattfindet, um die Gentranskription zu regulieren.⁴⁹ Während die Acetylierung zuallererst in Histonen nachgewiesen wurde, wurde ebenfalls berichtet, dass

zytoplasmatische Proteine auch acetyliert werden können. Die Acetylierung scheint damit eine größere Rolle in der Zellbiologie zu spielen als einfach nur ein Transkriptionsregulator zu sein.⁵⁰

2.1.7 Die Lipidierung

Proteine können Lipidierungen nutzen um an die Membranen von Organellen (ER, Golgi-Apparat, Mitochondrien), Vesikeln (Endosomen, Lysosomen) und/oder der Plasmamembran zu binden. Zu den vier Typen von Lipidierung gehören: der C-terminalen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), die N-terminalen Myristoylierung, die S-Palmitoylierung und die S-Prenylierung.⁴⁸

Jede Art dieser Modifikationen gibt den Proteinen unterschiedliche Membranaffinitäten, obwohl alle die Hydrophobizität des jeweiligen Proteins erhöhen und damit auch seine Affinität sich an Membranen zu heften. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass auch Kombinationen von Lipidierung an ein gegebenes Protein gebunden werden.⁴⁸

2.1.7.1 Der GPI-Anker

Der GPI-Anker dient als Haltegurt zwischen Zelloberflächenproteinen und der Plasmamembran. Diese hydrophoben Komponenten werden im ER hergestellt, wo sie dann zu dem entstehenden Protein gegeben werden. GPI-verankerte Proteine werden oft an Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Lipidflöße lokalisiert, die als Signal Plattformen auf der Plasmamembran agieren. Diese Art der Modifikation ist reversibel, da der GPI-Anker von dem Protein mit Hilfe der Phosphoinositid spezifischen Phospholipase C wieder freigesetzt werden kann.⁴⁸

2.1.7.2 N-Myristoylierung

Die N-Myristoylierung ist eine Methode um Proteine mit einem hydrophoben Griff für ihre Membranlokalisierung zu modifizieren. Die Myristoylgruppe selbst ist eine C14-Kohlenstoff-gesättigte Fettsäure, die dem Protein ausreichende Hydrophobizität und Affinität zur Verfügung stellt, um an der Membran zu binden, aber nicht genug, um dauerhaft in der Membran zu verankern. Die N-Myristoylierung kann daher als eine Art Konformations-Lokalisierungs-Schalter agieren, mit dessen Hilfe die Verfügbarkeit des hydrophoben Griffs reguliert und somit die Membranbefestigung des Proteins beeinflusst werden kann. Aufgrund dieser bedingten Lokalisierung sind Signalproteine, wie beispielsweise Kinasen der Src-Familie, N-myristoyliert. Die N-Myristoyltransferase (NMT) nutzt Myristoyl-CoA als Substrat, um die Myristoylgruppe an das N-terminale Glycin des Zielproteins zu befestigen. Da allerdings Methionin die N-terminale Aminosäure von allen eukaryotischen Proteinen ist, erfordert diese PTMs eine Abspaltung eben dieser Aminosäure durch die NMT bevor die Myristoyl-Gruppe verknüpft werden kann.⁴⁸

2.1.7.3 S-Prenylierung

Die Hydrolyse stabile S-Prenylierung fügt kovalent eine Farnesyl (C15)- oder eine Geranylgeranyl (C20)-Gruppe an spezifische Cystein-Reste innerhalb einer 5-Aminosäuren-Sequenz innerhalb des C-Terminus ein. Diese Modifikation wird mit Hilfe der Farnesyltransferase (FT) bzw. der Geranylgeranyl-Transferase (GGT I und II) erreicht. Etwa 2% aller Proteine, einschließlich aller Mitglieder der Ras-Superfamilie, sind prenyliert. Diese Gruppe von molekularen Schaltern wird farnesyliert oder geranylgeranyliert. Darüber hinaus haben diese Proteine spezifische 4-Aminosäuremotive am C-Terminus, die sogenannten CAAX-Box, welche den Typ der Prenylierung in einem oder zwei Cysteine bestimmt. Die Prenylierung selbst findet im ER statt und ist oft Teil eines schrittweisen Prozesses der

durch proteolytische Spaltung von Rce1 und durch die Methylierung von Cystein-Isoprenyl-Methyltransferase (ICMT) erfolgt.⁴⁸

2.1.7.4 S-Palmitoylierung

Im Zuge der S-Palmitoylierung fügt die Protein Acyltransferase (PAT) eine C16 Palmitoyl-Gruppe von Palmitoyl-CoA an die Thiolat-Seitenkette von Cystein-Resten. Wegen der längeren hydrophoben Gruppe kann dieser Anker dauerhaft das Protein an die Membran verankern. Diese Lokalisierung kann durch Thioesterasen umgekehrt werden, indem sie den Zusammenhang zwischen dem Protein und dem Anker erkennen und brechen. Die S-Palmitoylierung ist somit eine Art Schalter der verwendet werden kann, um die Membranlokalisierung zu regulieren. Zusätzlich wird die S-Palmitoylierung häufig verwendet, um andere Arten von Lipidierung zu unterstützen, wie die Myristoylierung oder Farnesylierung.⁴⁸

Folglich ist die Analyse von Proteinen und deren posttranslationalen Modifikationen von besonderer Bedeutung, insbesondere für die Untersuchung von Herzkrankheiten, Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen und Diabetes. Technisch gesehen sind die wichtigsten Herausforderungen bei der Untersuchung posttranslational modifizierter Proteine die Entwicklung von spezifischen Nachweis- und Reinigungsverfahren. Glücklicherweise sind diese technischen Hindernisse mit einer Vielzahl von neuen und raffinierten Proteomik-Technologien bereits realisierbar.

2.2 Die S-Palmitoylierung im Detail

Die Protein S-Acylierung kann ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen gefunden werden. Sie gehört zu den posttranslationalen Modifikationen, in denen Fettsäuren an Proteine kovalent gebunden werden. Die Mechanismen, mit denen Fette an Proteine acylierten werden können, sind vielfältig und umfassen mehrere Arten. Die am häufigsten vorkommenden sind, wie bereits erwähnt, die Prenylierung, die Myristoylierung und die Palmitoylierung (Übersicht Abschnitt 2.1).^{51,52}

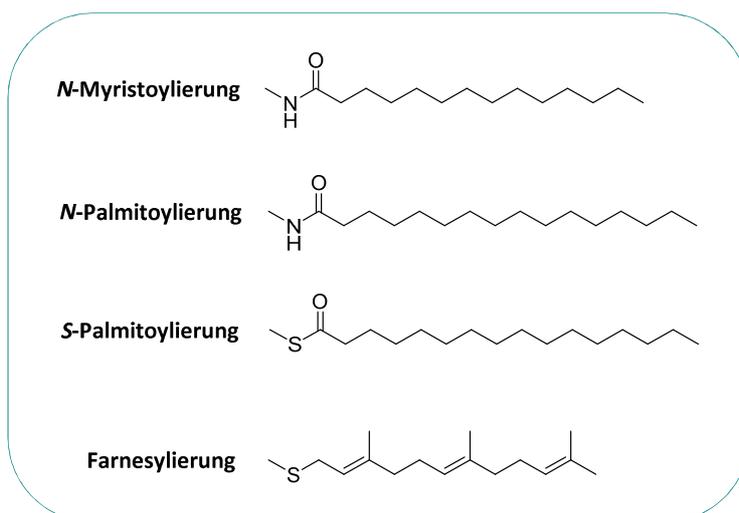


Abbildung 4: Strukturen von typischen Lipid-Modifikationen. N-Myristoylierung ist die Zugabe des 14-Kohlenstofflipides Myristat und tritt am N-terminalen Glycinrest auf. Die N-Palmitoylierung erfolgt über ein Thioester-Zwischenprodukt unter Verwendung des Thiols eines Cysteinrestes, gefolgt von einer Umlagerung zur irreversiblen Amidbindung. S-Palmitoylierung ist der Zusatz vom 16-Kohlenstoff Palmitat an einen Cystein-Rest über eine reversible Thioesterbindung. Farnesylierung ist die Anbringung einer 15-Kohlenstoff Farnesyl-Gruppe an einen Cystein-Rest über eine stabile Thioetherbindung.

Die Palmitoylierung oder *S*-Acylierung bezeichnet das kovalente Anbringen einer Fettsäuregruppe, in der Regel das gesättigte 16C-Palmitat, an Cysteinreste über eine Thioester-Bindung.^{52,53} Dieser Prozess unterscheidet sich deutlich von der *N*-Palmitoylierung, die sezernierter Peptide wie Sonic Hedgehog (Shh) nutzen.⁵⁴ Unter den verschiedenen Arten der Protein-Acylierungen ist die Palmitoylierung die am schlechtesten charakterisierte Modifizierung in Bezug auf die dort beteiligten Enzyme sowie der Identität der spezifischen Substrate und die funktionellen Konsequenzen der Protein Palmitoylierung. Diese schlechte Charakterisierung lässt sich zu einem großen Teil auf einem Mangel an sensitiven und quantitativen Tests zurückführen. Die Palmitoylierung unterscheidet sich in mehreren Punkten von anderen Arten der Acylierung. Im Gegensatz zur Prenylierung und Myristoylierung gibt es für die Palmitoylierung keine klare Konsensus Sequenz⁵² und potentielle Palmitoylierungsseiten lassen sich in der Regel nicht so einfach aus der Proteinsequenz ableiten. Ausnahmen bilden die Fälle, in denen nur ein einzelner Cysteinrest existiert. Als Folge ist die Identifikation von spezifischen Palmitoylierungsstellen auf einem Protein in der Regel nicht trivial. Die am häufigsten verwendete Methode, um Palmitoylierungsstellen im Protein oder einer Sequenz zu identifizieren, ist die gerichtete Mutagenese von Cysteinresten.^{55,56} Allerdings sollte man bei der Interpretation dieser Daten Vorsicht walten lassen, da durch Mutationen eines bestimmten Cysteinrestes Konformationsänderungen induziert werden können, welche wiederum die Palmitoylierung an einer anderen Stelle potentiell beeinflussen könnten. Andere Verfahren, wie die Massenspektrometrie, können auch zur Identifizierung von Palmitoylierungsseiten herangezogen werden. Aber diese Verfahren können technisch sehr anspruchsvoll sein und erfordern in der Regel größere Mengen des aufgereinigten Proteins.⁵⁷ Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit der Palmitoylierung zu anderen Acylierungstypen besteht darin, dass nur bei der Palmitoylierung die integralen Membranproteinen signifikant als Substrate dienen. Da die Membranproteine selbst nicht so häufig vorkommen und ihre Aufreinigung weitaus schwieriger als die von zytoplasmatischen Proteinen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Anzahl von palmitoylierten Membranproteinen durchaus unterschätzt wurde. Nichts desto trotz gibt es bereits eine große Anzahl von Membranproteinen, insbesondere Rezeptoren und Ionenkanäle, bei denen Palmitoylierungen gefunden wurden.^{58,59} Ihre Palmitoylierung tritt an mehrere subzellulären Orten auf, wie beispielsweise am Punkt ihrer Synthese im ER⁵⁹, oder entlang des sekretorischen Weges und in der Plasmamembran selbst.⁶⁰ Während es bekannt ist, dass die Palmitoylierung die Membranassoziation von zytoplasmatischen Proteinen erhöht, ist ihre Signifikanz für Proteine der integralen Membran weniger klar. Eine Funktion könnte darin bestehen Membranproteine zu ihren Ziel-Mikrodomänen zu bringen (Lipidflöße). Dies ist der Fall für das Influenza-Virus-Glykoprotein Hämagglutinin (HA)⁶¹ und auch für andere Proteine, bei denen die Hemmung der Palmitoylierung eine Aufteilung in Lipidflöße verhindert.^{62,63} Die Palmitoylierung könnte auch entscheidend für die funktionale Konformation oder die Protein-Protein Wechselwirkungen von Membranproteinen sein. Schließlich ist die Palmitoylierung die einzige Acylierung welche dynamisch ist und somit mögliche Aktivierungen oder Signalmodifikationen reguliert. Wie bei der Protein-Phosphorylierung gibt es auch hier zelluläre Enzyme, die vermitteln und spezifizieren, welche Proteine palmitoyliert und depalmitoyliert werden (Abbildung 5). Die Protein Acyltransferasen (PATs), sind Enzyme die Protein-Palmitoylierungen direkt lenken, indem sie Palmitoylgruppen ausgehend von Acetyl-CoA katalytisch auf die Proteine übertragen. Das erste PAT wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt.⁶⁴ Diese Enzyme kommen in bisher allen untersuchten eukaryotischen Genomen vor und lassen sich in Klasse 1 und 2 unterteilen, je nachdem, ob die Proteine zuvor *S*-farnesyliert oder *N*-myristoyliert waren. Allgemein können PATs in drei Kategorien in Abhängigkeit ihrer Struktur unterteilt werden: ankyrin-wiederholend, heterodimer oder monomer.⁶⁵ Alle bekannten PATs sind integrale Membranproteine und somit kann die Substraterkennung und Katalyse nur dann auftreten, wenn die

Proteinsubstrate zuvor an die zugehörige Membran über eine andere Affinitätsmarkierung verankert wurden (Lipidierung, Transmembran-Domäne, etc.). Das DHHC-Motiv (Asp-His-His-Cys) gehört zu der katalytischen Domäne der PATs und es hat sich gezeigt, dass Mutation des Cysteinrestes die Palmitoylierung aufheben. Das DHHC-Motiv liegt in der Regel innerhalb einer Cystein-reichen Domäne (CRD) zwischen zwei Transmembranregionen. Es zeigt in Richtung des Zytosols, was dabei helfen könnte, die schwach an die Membran anhaftenden Substrate näher an die katalytischen Seite des Enzymes zu bringen.⁶⁵ Die meisten Genome kodieren für mehr als ein PAT und mit unterschiedlicher Lokalisierung. Die Mechanismen die ihre spezifische subzelluläre Verteilung, Substratspezifität und Regulationsweise diktieren sind bis heute unbekannt. Sowohl extrazelluläre Faktoren sowie unterschiedliche posttranslationale Modifikationen scheinen die Aktivität der PATs zu beeinflussen.⁶⁶ Im Jahre 2010 wurde in einer Studie diskutiert, dass DHHC-Proteine selbst palmitoyliert sind und dass dies zu ihrer Substratspezifität, zum Anhaften an spezifische Membranmikrodomänen sowie zum Schutz von Ubiquitinierung und/ oder der Einstellung von verschiedenen Regulatoren beitragen könnte.⁶⁷

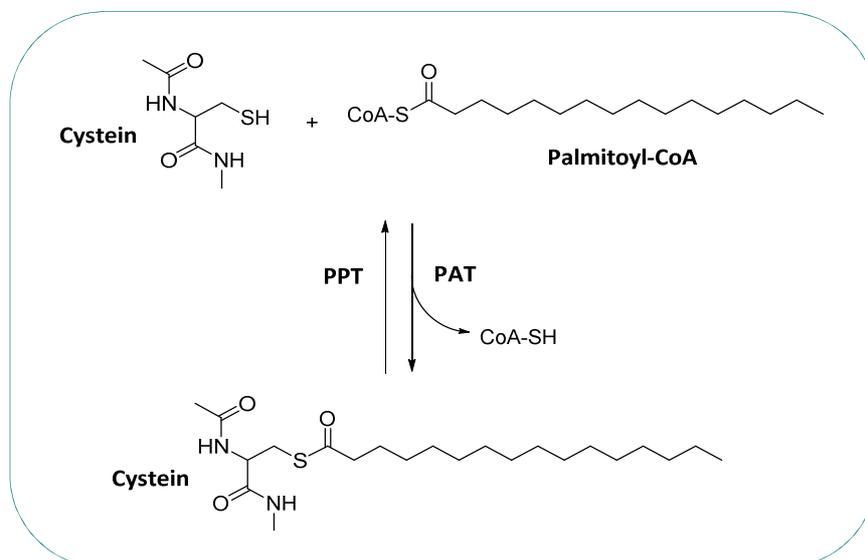


Abbildung 5: Reversible S-Palmitoylierung. Palmitat wird aus Palmitoyl-CoA, die durch Acyl-CoA-Synthetase produziert wird, an ein Protein durch Protein-Acyl (PAT) überführt. Im Gegensatz dazu wird Palmitat von Proteinen durch die Palmitoyl-Protein-Thioesterase (PPT) gespalten.

Wie bereits erwähnt, hat die S-Palmitoylierung zwei einzigartige Eigenschaften im Vergleich zu anderen Lipidierungen. Sie wirkt sich stark auf die Membranaffinität eines Proteins aus. Der Palmitoylrest alleine bietet eine 100-fach stärkere Membranassoziation als ein einzelner N-Myristoyl-Rest und der Vorgang ist reversibel. In Studien konnten Rocks et. al zeigen, dass die spezifische subzelluläre Verteilung von H- und N-Ras-GTP-bindenden Proteinen durch einen konstitutiven De-/Reacylierungszyklus erzeugt wird, der an palmitoylierten Proteinen arbeitet und ihren schnellen Austausch zwischen der Plasmamembran (PM) und dem Golgi-Apparat antreibt.^{33,34} Die Reversibilität bietet eine flexible, schnelle und präzise Art der Regulation der Proteinaktivität bei einer relativen Zeitskala. Durch die Depalmitoylierung tritt das Protein in einen Zustand, indem es rasch an die Membran verankert und mit Hilfe eines Vesikel-unabhängigen Vorgangs auch wieder von den Membranen gelöst werden kann. Der S-Acylierungsstatus eines Proteins ändert sich wahrscheinlich mehrmals während seiner Lebenszeit und kann als Ergebnis der Aktivierung oder Deaktivierung von Signalisierungswegen auftreten.⁶⁵ Bisher wurden vier lösliche menschliche Thioesterasen als depalmitoylierende Enzyme charakterisiert. Die lysosomalen Palmitoyl-Protein-Thioesterasen PPT1 und PPT2 fungieren während des Proteinabbaus und tragen nicht zur Dynamik der Signalwege bei. Die

Kristallstruktur von PPT1 (Rind) allein oder im Komplex mit Palmitat oder einem anderen Inhibitor wurde bereits gelöst.⁶⁸ Dabei konnten keine dramatischen strukturellen Veränderungen zwischen den verschiedenen Situationen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind die Acyl-Protein-Thioesterasen APT1 und APT2 kleine Proteine, die weitgehend Zytosolisch und weit konserviert in Hefen bis hin zum Menschen vorkommen.^{52,68,69} Die APT1 apo-Struktur wurde bereits erschlossen⁷⁰ und ihr freier Status ist gekennzeichnet durch eine Dimerisierung und Blockierung des aktiven Zentrums, was darauf hindeutet, dass die Substratbindung zu einer Dimer-Dissoziation und Katalyse führen könnte. APT1 scheint keine spezifische Proteinsequenz zu erkennen, und es wird angenommen, dass eine Konformationsänderung oder Dissoziation eines Bindungspartners in der Nähe der Palmitoyl-Gruppe auftreten muss, damit das Substrat für eine Spaltung zugänglich gemacht wird. APT1 depalmitoyliert nicht nur den C-Terminus kleiner GTPasen, in sowohl *D*- als auch *L*-Aminosäure-Form, sondern auch³³ andere G-Proteine⁷¹, wie Ghrelin (Deoctanoylierung)⁷², virale Glykoproteine⁷³ und Lysophospholipide.⁷⁴ In Bezug auf die Substraterkennung, ist APT2 weniger gut erforscht. Weiterhin ist bekannt, dass defektes PPT1 in einer neurodegenerativen Erkrankung, der infantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose oder auch Batten Krankheit genannt, vorkommt.^{75,76}

Da die stationäre Lokalisation und Funktion verschiedener peripherer Membranproteine, wie der Ras-Spezies, kritisch durch Zyklen der Depalmitoylierung und Repalmitoylierung kontrolliert werden starteten Dekker *et al.* eine Studie zur Entwicklung und Charakterisierung eines potenten Inhibitors der Acylprotein-Thioesterase 1 (APT1), der den zellulären Acylierungszyklus auf der Ebene der Depalmitoylierung stört und dadurch einen Verlust der präzisen stationären Lokalisation von palmitoyliertem Ras verursacht.^{77,78} Weitere Studien von Cravatt *et al.* gingen ebenfalls auf die Suche nach chemischen Werkzeugen zur Untersuchung von Acylprotein-Thioesterasen. Sie starteten eine Hochdurchsatz-Kampagne zur Identifizierung von Inhibitoren von LYPLA1 und der strukturell verwandten LYPLA2. Dabei fanden sie die zwei reversible Verbindungen ML348 und ML349, die als selektive Inhibitoren in hohem Maße die Untersuchungen der biologischen Funktion von LYPLA1 und LYPLA2 beitragen sollten.^{77,78}

Um ein breiteres Verständnis der Rolle der Protein Palmitoylierung zu erhalten, benötigt man eine umfassendere Identifikation der beteiligten Proteinen an eben dieser Modifikation sowie ein Verständnis für die Enzyme, die palmitoylieren und depalmitoylieren.⁵⁹

2.3 Die Ras-Superfamilie

In den menschlichen Zellen gibt es drei sogenannte Ras-Gene, die die vier Ras-Proteine der hochkonservierten Ras-Superfamilie kodieren. Zu ihnen gehören *H*-Ras (*Harvey rat sarcoma viral oncogene*), *N*-Ras (*Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene*) sowie die zwei Varianten *K*-Ras4A und *K*-Ras4B (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene 4A/B*).^{75,76} Seit dem Jahre 1983 ist bereits bekannt, dass sich die Gene des ubiquitär vorkommenden Ras-Proteins auf dem Chromosom 12 (*K*-Ras Gen), dem Chromosom 2 (*H*-Ras Gen) und dem Chromosom 1 (*N*-Ras Gen) befinden.⁷⁹ Im menschlichen Organismus werden folgende Proteine in diese Superfamilie eingeordnet: Die vier Ras-Proteine: *H*-Ras, *N*-Ras, *K*-Ras4A und *K*-Ras4B, gefolgt von den vier Rap-Proteine: Rap1a, Rap1b, Rap2a und Rap2b, den zwei *R*-Ras ähnlichen Proteinen: *R*-Ras und TC21 und schließlich die zwei Ral-Proteine: RalA und RalB und das Rheb-Protein.⁸⁰ Die Proteine der Superfamilie gehören zu den kleinen GTPasen, die wie ein molekularer Schalter in zwei unterschiedlichen Aktivitätszuständen in der Zelle vorkommen können. Der GDP (Guanosindiphosphat) gebundene Zustand beschreibt den inaktiven Zustand der Ras-Proteine, wohingegen der Austausch zu GTP (Guanosintriphosphat) zu einer Aktivierung der Proteine

führt. Im aktiven Zustand angekommen, können die Ras-Proteine ihren Funktionen, wie beispielsweise der Membranassoziation und der Weiterleitung von Signalen ins Innere der Zelle, nachkommen.⁸¹ Weitere Funktionen der Ras-Proteine liegen in der Regulation der Zellproliferation, des Zellzyklus⁸² und der Zell-Differenzierung.⁸³ Zusätzlich beeinflussen sie über Integrin vermittelte Signalübertragungen den Prozess der Apoptose⁸⁴ und können die Angiogenese regulieren.⁸⁵ Im sogenannten Ruhezustand der Zelle sind bis zu 99 % der vorkommenden Ras-Proteine in ihrem inaktiven Zustand.⁸⁶ Erst nach der Bindung eines extrazellulären Liganden an den jeweiligen Rezeptor, wie beispielsweise EGF, kann es zu einer Dimerisierung und somit zu einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase kommen. Durch die darauffolgende Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten in intrazellulären Regionen des Rezeptors und der Anbindung des Adaptorproteins (Grb2), welches in einem Komplex mit dem Protein SOS verbunden ist, kann der Ras-SOS-Komplex den Austausch von GDP zu GTP vollziehen. Dieser Vorgang wird weiter dadurch unterstützt, dass GTP in einer höheren Konzentration in der Zelle vorkommt als GDP.⁸⁷ Im Falle des SOS Proteins, der den GDP-GTP-Austausch beschleunigt, spricht man auch von einem sogenannten *Guanine nucleotide exchange factor*, kurz GEF, zu der eine Vielzahl von Proteinen gehört. Im aktiven Zustand können die Proteine dann ihren unterschiedlichen Aufgaben nachkommen, indem sie an unterschiedlichen Effektorproteinen binden und so Signaltransduktionswege regulieren. Ein sehr bekanntes Effektorprotein ist die Serin/Threonin-Kinase Raf. Da eine Deaktivierung der Ras-Proteine durch die langsame intrinsische GTPase-Aktivität der Proteine selbst nicht zu einer effizienten Abschaltung der Signaltransduktion führen würde, wird die Inaktivierung über sogenannte GAPs (*GTPase-activating-Proteins*) reguliert.^{88,89} Sie katalysieren die Hydrolyse der GTP-gebundenen Ras-Isoform um das 10^5 -fache.⁹⁰⁻⁹⁴

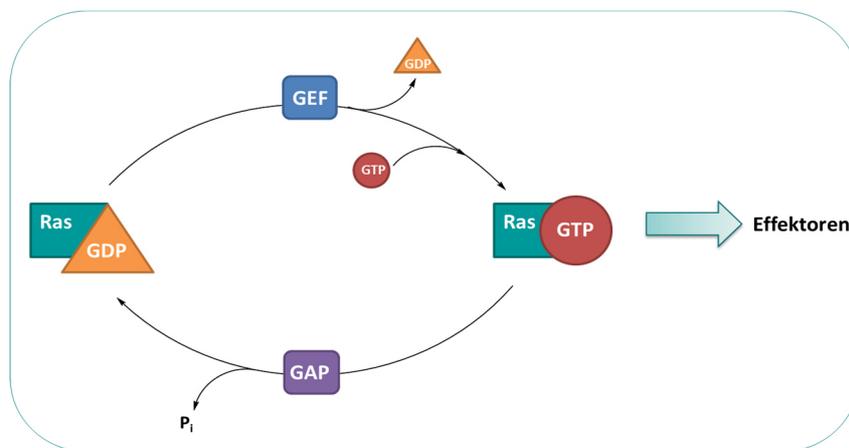


Abbildung 6: Schematische Darstellung des molekularen Schalters Ras. GEFs katalysieren den Austausch vom inaktiven GDP-Zustand in den aktiven GTP-Zustand der Ras-Isoformen. In der aktiven Form kann das Ras-Protein mit intrazellulären Effektoren interagieren. GAPs ermöglichen dabei die Hydrolyse des GTPs und somit den Übergang in die inaktive GDP-Form.^{88,89}

Es ist schon seit langem bekannt, dass onkogene Ras-Mutanten eine gestörte intrinsische GTPase-Aktivität aufweisen, die sich durch eine Intensivität gegenüber GAPs kennzeichnet.⁹⁵⁻⁹⁹ Unter anderem führen Punktmutationen in verschiedenen Ras-Kodons zur Ausbildung von Karzinomen. Eine der bekanntesten Punktmutationen ist die des Kodons 12, welches einen Austausch der Aminosäure Glycin zu Valin bzw. Asparaginsäure zur Folge hat und eine Affinität des Ras-Proteins zu seinem GTP-gebundenen Zustand mit sich bringt, wodurch die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras erhöht wird und dieses permanent aktiv bleibt.⁸⁹ Diese fehlerhafte Regulation führt dann zu einer gesteigerten

Proliferation durch die permanenten Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade und letztendlich zu einer Krebserkrankung.^{100,101}

Allgemein bestehen die Ras-Isoformen *H-Ras*-, *N-Ras*- und *K-Ras4B*-Proteine aus 188 Aminosäuren, wohingegen *K-Ras4A* eine weitere Aminosäure besitzt.^{102,103} Zudem zeigen die vier Isoformen innerhalb der ersten 86 Aminosäuren keinerlei Unterschiede. Dieser Bereich definiert die sogenannten Schalter Regionen 1 und 2.^{104,105} Die Aminosäuren 32 bis 40 umfassen die Schalter Regionen 1, welche für die Interaktion mit Effektorproteinen notwendig ist und deshalb auch als Effektor-Domäne bezeichnet wird. Die Aminosäuren 63 bis 73 umfassen die zweite Schalter-Region, welche mit an der Aktivierung der Ras-Isoformen beteiligt ist, indem sie den Guaninnukleotid-Austausch vermittelt.

H-Ras	Q H K L R K L N P P D E S G P	G C M S C K C V L S
N-Ras	Q Y R M K K L N S S D D G T Q	G C M G L P C V V M
K-Ras4A	Q Y R L K K I S K E E K T P	G C V K I K K C I I M
K-Ras4B	K H K E K M S K D G	K K K K K S K T K C V I M

Abbildung 7: Hypervariable Domänen der vier Ras-Isoformen. Markierter Bereich: Notwendige Funktionen zur Lipidverankerung und das CAAX-Motiv.¹⁰⁴

Die letzten 25 Aminosäuren der Ras-Proteine (Abbildung 7) bilden die sogenannten hypervariablen Domänen, welche neben den Informationen zur Lipidverankerung (Cysteine für die Anbringung von Palmitoyl oder poly-Lysin Sequenzen für den elektrostatischen *Switch*) zusätzlich das CAAX-Motiv tragen. Im CAAX-Motiv steht dabei C für Cystein, A für eine beliebige aliphatische Aminosäure und X kann entweder durch ein Serin oder Methionin belegt werden.^{102,103}

Wie bereits erwähnt, werden Ras-Proteine im Zytosol der Zelle synthetisiert und erfahren dort auch eine posttranslationale Modifikation, um eine Verankerung und somit eine Interaktion mit der Plasmamembran zu ermöglichen. Diese Modifikationen erfolgen in mehreren aufeinander bauenden Schritten am bereits gezeigten CAAX-Motiv der Carboxy terminalen Domäne (Abbildung 8).

Nach der Farnesylierung des Cysteinrestes in der CAAX-Box wird das Ras-Protein an die zytosolische Membran des ER transportiert, wo die Proteolyse der letzten drei Aminosäuren des Motivs (-AAX) durch die Endopeptidase Rce1 entfernt werden.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Im darauffolgenden Schritt überträgt die Isoprenylcystein-Carboxyl Methyltransferase (Icmt) ein Methylrest auf die α -Carboxyl Gruppe des carboxy-terminalen farnesylierten Cysteinrestes.¹⁰⁹ Die drei Isoformen *H-Ras*, *N-Ras* und *K-Ras4A* werden anschließend einer Palmitoylierung an den Cystein-Resten ihrer hypervariablen Domänen unterzogen und mittels Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert.¹¹⁰ Im Gegensatz dazu wird *K-Ras4B* nicht palmitoyliert, sondern wird über Mikrotubuli abhängige Mechanismen oder auch über passive Diffusion an die Plasmamembran gebracht.¹¹¹

Jüngste *in vivo* Studien zeigen, dass die δ -Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase (PDE δ), die eine hydrophobe prenylbindende Tasche besitzt, in der Lage ist, als potentieller Bindungspartner für farnesylierte Proteine zu fungieren. Auch wenn PDE δ als zytosolischer Träger für Ras-Proteine

vorgeschlagen wurde, bleibt der funktionale Transportmechanismus nach wie vor weitgehend unklar.¹¹²

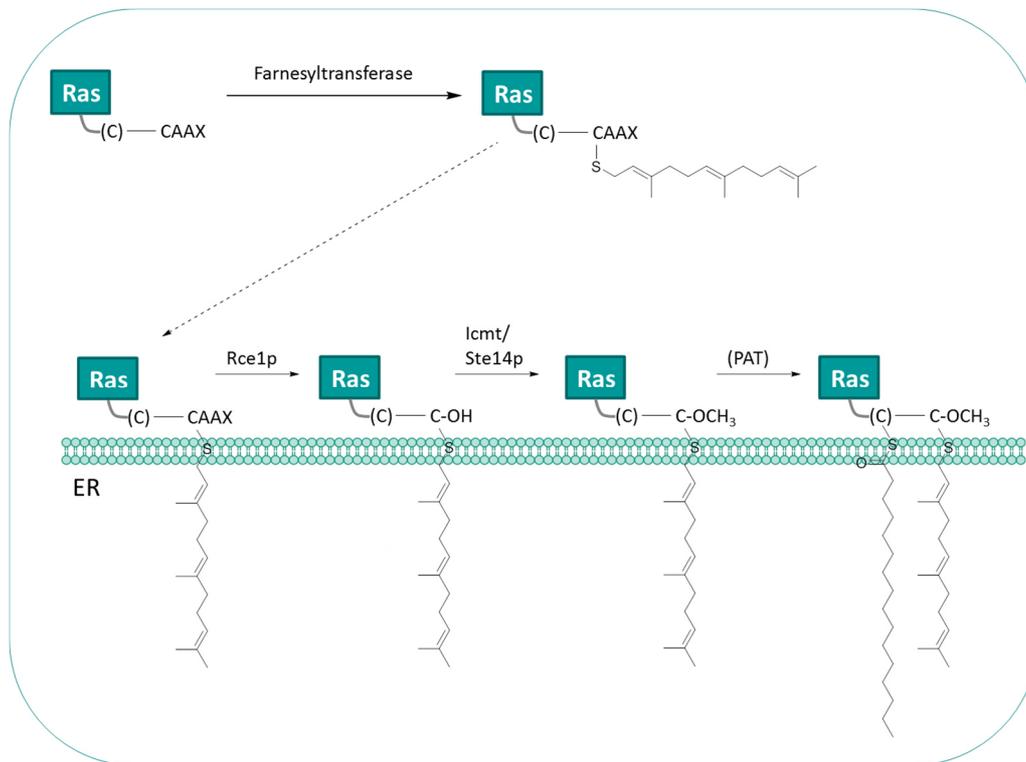


Abbildung 8: Prozessierung der carboxy-terminalen Sequenz der Ras-Proteine. Nach der Farnesylierung im Zytosol werden die naszenten Ras-Proteine an das ER gebracht, dort werden die letzten drei AS (-AAX) des CAAX-Motives entfernt und der endständige Cysteinrest methyliert. Während *H-Ras*, *N-Ras* und *K-Ras4A* einer zusätzlichen Palmitoylierung an den Cystein-Resten ihrer hypervariablen Domäne unterzogen werden, erreicht *K-Ras4B* seine Assoziation an die Membranen durch seine carboxyterminalen Polylysin-Reste.^{106-109,111}

An der Plasmamembran angelangt, erfolgt die Assoziation dieser Isoform über die carboxyterminalen Polylysin-Reste (elektrostatischer *Switch*) innerhalb seiner hypervariablen Region. Den durch die Isoprenylierung erhaltenen hydrophoberen Charakter können die Proteine nutzen, um ihre Verankerung an die Membranen zu gewährleisten und dadurch ihre biologische Aktivität zu bestimmen. Im Rahmen von Membranassoziationsstudien der Ras-Proteine konnten unterschiedliche Verteilungen der betreffenden Isoformen in der Plasmamembran nachgewiesen werden.¹¹³

Während *H-Ras* sowohl in *non-raft* als auch in *raft* Domänen der Plasmamembran verteilt vorkommt, kann sich dessen Lokalisierung durch die Veränderungen des Gehalts an seiner GTP-gebundenen Form zu den *non-raft*-Bereichen hin verschieben.^{114,115} Wohingegen *K-Ras4B* hauptsächlich in diesen *non-raft* Domänen aufzutreffen ist.^{114,115} *N-Ras* kann sowohl mit *H-Ras* in der Plasmamembran Co-lokalisieren, als auch in Caveolin aggregierten Lipidflößen gefunden werden.¹¹⁶

In einem kombinierten chemisch-biologischen und biophysikalischen Ansatz wurde von Weise *et.al* die Aufteilung von unterschiedlich lipidierten Ras-Proteinen mit verschiedenen Membran-Populations-Motiven in Lipid-Domänen kanonischer Modell-Floß-Mischungen mit der Rasterkraft-Mikroskopie untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass die *K-Ras4B*-GTPase, unabhängig von ihrer GDP-/ GTP-Beladung, in der flüssig-ungeordneten (*l_d*) Phase lokalisiert und neue proteinhaltige Fluidomänen bildet, die mehrwertige saure Lipide durch einen wirksamen elektrostatischen Lipidsortiermechanismus rekrutieren. Umgekehrt verteilen sich palmitoylierte und farnesylierte *N-*

Ras-Proteine in die I_d -Phase und konzentrieren sich an der I_d/I_o -Phasengrenze heterogener Membranen.^{117,118}

Diese Erkenntnis, nämlich die unterschiedliche Lokalisation der Ras-Proteine in der Plasmamembran, bekräftigt die Hypothese einer ebenso Isoform spezifischen Verteilung ihrer Funktionen für die Zelle. Was wiederum durch das unterschiedliche Vorkommen von Ras-Mutationen in humanen Karzinomen bekräftigt wird.³⁴

3 Zielsetzung der Arbeit

Proteine können posttranslational mit einem Lipidmotiv modifiziert werden. Diese Lipidmotive erlauben den betroffenen Proteinen mit diversen Membranen zu assoziieren und mit anderen Proteinen zu interagieren. Zu den bekanntesten Lipidierungen gehören beispielsweise der Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), die C-terminale S-Prenylierung, die N-terminale Myristoylierung und die S-Acylierung von Cysteinen, die besser bekannt ist als S-Palmitoylierung. Mit Ausnahme des labilen Thioesters der S-Acylierung von Cysteinen werden all diese Modifikationen permanent in das jeweilige Protein installiert. Andere bekannte Lipidierungen sind zum Beispiel die Cholesterylierung der Proteine der Hedgehog Familie oder die noch relativ unübliche reversible Konjugation des Ubiquitin-artigen Hefeproteins Atg8 (*Autophagy-related protein 8*) oder dessen Säugetier verwandte Variante, dem aus der Autophagie bekanntem LC3, mit einem Phosphatidylethanolamin (PE).

Es ist schon seit langem bekannt, dass Misregulationen in den Lipidierungen von Proteinen zu schweren Erkrankungen, wie Diabetes, Adipositas, Arteriosklerose, koronare Herzerkrankung, Hirnverletzungen und nicht zu vergessen Krebsarten führen können.³ Die Entwicklung analytischer Werkzeuge und Strategien, um diese Vielfalt von Molekülstrukturen entschlüsseln zu können, ist bereits ein wesentlicher Schritt, um die Lipidomik aus dem Schatten der Genomik, Proteomik und Metabolomik zu lösen.

Frühere Studien haben bereits die Bedeutung der Fettsäurezusammensetzung S-acylierter Proteine hervorgehoben. Allerdings bleibt eine systematische Untersuchung und klare Identifizierung der S-gebundenen Fettsäuren im nativen Zustand problematisch, vor allem wegen des Mangels an geeigneten Methoden. Eine häufig verwendete Technik zur Identifizierung lipidierten Proteinen ist die metabolische Markierung mit Azid-/ Alkin-markierten oder radioaktiven Fettsäuren.¹¹⁹ Allerdings können diese exogen zugegebenen Lipide zu kürzeren, längeren oder ungesättigten Fettsäuren metabolisiert werden, wodurch eine klare Identifizierung von Lipidresten im nativen Zustand unmöglich wird. Darüber hinaus kann sich durch die exogene Zufuhr die Zusammensetzung der Thioester-verknüpften Proteinen verändern, was zu einem breiten Spektrum von S-Acyllipiden (z.B. Myristat, Stearat, Oleat, Linoleat oder Arachidonat) führt, was darauf hinweist, dass die PATs, die für ihre Synthese verantwortlich sind, eine breite Substratspezifität besitzen.¹²⁰ Ferner kann das gesamte Proteom S-acylierter Proteine auch durch den Acyl-Biotin-Austausch analysiert werden.^{57,59} Diese Methode macht sich die Empfänglichkeit der Fettsäure-Acylthioesterbindung gegenüber der Spaltung mit neutralen Hydroxylaminen zu nutze. Eine anschließende Markierung der resultierenden freien Sulfhydryle mit biotinhaltigen Maleimiden ermöglicht allerdings keine Identifizierung der langkettigen Fettsäuren. Darüber hinaus bleibt die direkte Analyse von lipidierten Peptiden in verdauten Proben aufgrund der hohen Hydrophobie der Sonden und ihrer schlechten Ionisation während der Massenspektrometrie (MS)-Analyse eine Herausforderung. Vor kurzem wurde ein Verfahren zur Gaschromatographie, gekoppelt an die Massenspektrometrie (GC-MS), entwickelt, um die an S-acylierten Proteinen gebundenen Lipide zu analysieren und zu identifizieren. Allerdings erfordert dieser Ansatz eine hohe Reinheit und große Mengen an Proteinen, was es als Durchsatzverfahren nicht praktikabel macht.¹²¹⁻¹²³ Gegenwärtige Methoden bedürfen immer noch starker Verbesserungen und die Entwicklung robuster und allgemeiner Methoden, die eine direkte Analyse von S-acylierten Proteinen auf der endogenen Ebene ermöglichen, bleibt somit ein höchst interessanter Bereich der derzeitigen Forschung.

Wie bereits erwähnt, wurden in den letzten Jahren enorme Fortschritte im Bereich der Bioorthogonalen Reaktionen, der Proteomik und bei der Aufklärung posttranslatiionaler Modifikationen erzielt, aber dennoch bleiben viele wichtige Fragestellungen bis heute unbeantwortet:

Wie können Lipide die Funktion von Proteinen steuern?

Woraus besteht die Diversität der Lipid-modifizierten Proteine?

Wie kann diese Diversität einen Einfluss auf die Aktivität, die Lokalisation, die Verteilung der Membranmikrodomänen und nicht zuletzt auf die Interaktion mit anderen Proteinen haben?

Es gibt mehr als 1000 verschiedene Lipide, die durch eine kaum vorzustellende Kombination aus Acylketten und den unterschiedlichsten Kopfgruppen zusammengesetzt werden können. Diese Kombinationsvielfalt führt letztendlich zu einer komplexen, diversen, dynamischen und höchst heterogenen zellulären Lipid-Komposition, die im Detail untersucht werden sollte.

Es wurde bereits gezeigt, dass gesättigte und ungesättigte Lipide sich unterschiedlich in den Regionen der Membranen verteilen. Jedoch wurde der Einfluss der Lipid-Vielfalt auf die Lipid-modifizierten Proteine, nicht als regulativ für die Protein-Lokalisierung angesehen und ihre Aktivität nicht berücksichtigt.

Allgemein gilt, dass die Acylierung größtenteils auf Cysteinreste limitiert ist. Dabei zählt das gesättigte Palmitoyl zu den bekanntesten Lipiden, die im Zuge einer Acylierung durch PATs übertragen werden. Dieser Prozess wird häufig nur als Palmitoylierung oder *S*-Palmitoylierung bezeichnet und ist durch die labilen Eigenschaften der Thioesters-Verknüpfung reversibel. Dieser dynamische Palmitoylierungs-/DePalmitoylierungs Zyklus ist besonders für die Lokalisierung und Funktion der Ras-Familie bekannt.

Im Falle von palmitoylierten Proteinen akzeptiert jeder Forscher, dass diese Proteine mit Palmitinsäure modifiziert werden. Aber unsere Hypothese ist nun, dass nicht nur Palmitinsäure, sondern auch andere Lipide an diese Proteine gebunden werden. Einige Vorstudien wurden bereits unternommen, die diese Hypothesen unterstreichen. Für das Shh-Protein wurde zum Beispiel von einer *N*-Palmitoylierung berichtet und auch Wnt-Proteine zeigen Sonderfälle, in denen Palmitoleinsäure durch eine *O*-Acylierung an einen Serinrest gebunden ist. Ähnlich konnten auch andere Lipide, wie Stearin- oder Arachidonsäure auf Cysteinresten bereits identifiziert werden. Diese Indizien könnten eine zusätzliche Rolle in der Regulation der Proteinlokalisierung und Funktion spielen.

Ein alternatives Verfahren, um das Vorhandensein und den Einfluss von ungesättigten Fettsäuren an Proteinen zu entdecken, könnte mit Hilfe von CLN3 erfolgen. Seit kurzem wurde die Existenz einer *S*-verknüpften Palmitoyl-Protein Δ -9-Desaturase (CLN3P) vorgeschlagen, die Doppelbindungen in *S*-palmitoylierte Cysteine von Proteinen einfügen könnte. Die Einzigartigkeit dieser Proteinklasse würde dabei darauf beruhen, dass die Desaturierung der *S*-acylierten Proteinen bisher nicht als Modifikation in Betracht gezogen worden ist, welche auch die Lokalisierung der Protein Mikrodomänen, ihre Aktivität oder selbst die Interaktion lipidiertes Proteine mit anderen Effektoren beeinflussen kann.

Man weiß, dass defektes CLN3 für die sogenannte Batten-Krankheit (Juvenil Neuronale Ceroid Lipofuszinose) verantwortlich ist. Diese Erkrankung zählt zu der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung im Kindesalter. Doch die exakte Rolle dieses Proteins ist bis heute noch unbekannt. Auch die Möglichkeit, dass Proteine posttranslational mit ungesättigten Fettsäuren lipidiert werden

könnten, wurde bis dato noch nicht untersucht und bleibt ein höchst interessanter Bereich der Forschung.

Das Hauptziel dieses Projektes ist es zu klären, ob die hohe Diversität in den Lipidzusammensetzungen von Membranen auch in den Lipid-modifizierten Proteinen nachgewiesen werden kann. Ebenso gilt es die Rolle des CLN3-Proteins in diesem Bereich zu klären.

4 Ergebnisse und Diskussion

Um einen ersten Einblick in die Lipidzusammensetzung des Palmitoms zu erhalten, wurde eine von *Drisdell und Green* initialisierte Methode zur Analyse von palmitoylierten Proteinen für die Bedürfnisse der in dieser Arbeit entwickelten Analysemethode modifiziert. Nach Isolation des Proteoms, sollten die in Form von Thioestern reversibel an die Proteine gebundenen Lipide durch einen Hydroxylamin-Linker chemisch isoliert und mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abschnitt 10.6). Ferner sollte die Lipid-Analyse ausgewählter Proteine erfolgen, die zuvor mittels stabiler Transfektion in unterschiedliche Zelllinien eingefügt wurden.

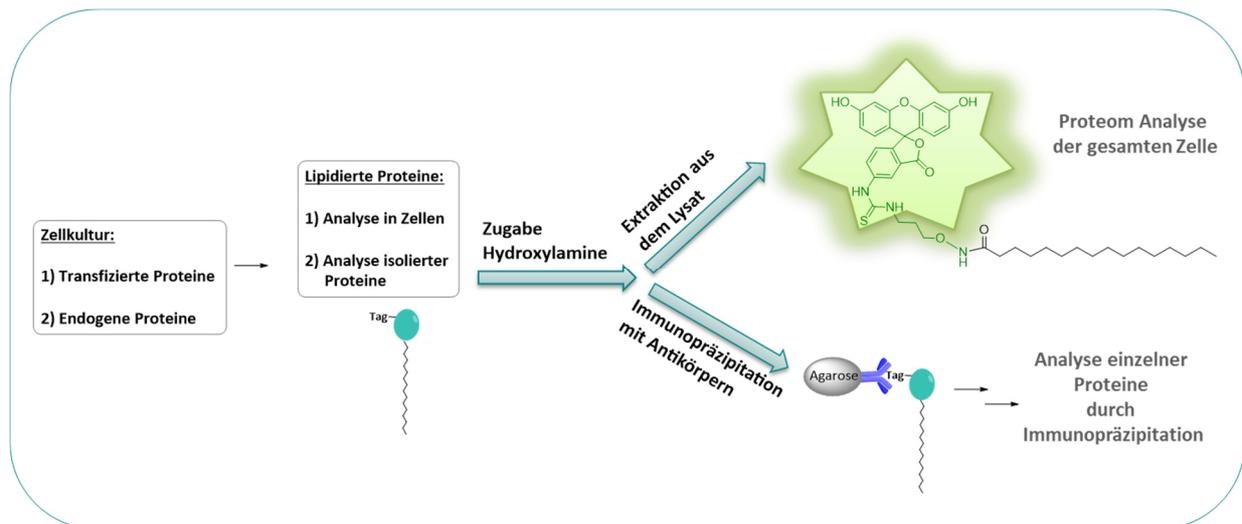


Abbildung 9: Schematische Darstellung des generellen Konzeptes zur Analyse der Lipidmuster von Proteinen.

4.1 Synthese der Hydroxylamin-Linker

Wie oben erwähnt, können die labilen Thioester selektiv durch die Behandlung mit Hydroxylaminen gespalten werden, was zur Erzeugung eines freien Sulfhydryls und der Umwandlung der freigesetzten Fettsäure als Fettsäurehydroxamat führt. Folglich fiel unsere Wahl auf ein konventionell funktionalisiertes Hydroxylamin, welches als Sonde zur Analyse der S-verknüpften Fettsäuren in unseren Studien dienen sollte. Dazu sollte zuerst der Pentafluorbenzyl-Linker (Abbildung 10) als Linker für die Analyse von Fettsäurehydroxamaten unter Verwendung von GC-MS fungieren. Pentafluorbenzyl-Derivate sind aus der Literatur bekannte und teils kommerziell erhältliche Derivatisierungsreagenzien, wie beispielsweise PFBHA (O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)hydroxyamin) das mit Carbonylen zu den entsprechenden flüchtigeren Oximen reagieren kann. Durch diese Derivatisierung kann man insbesondere polare Verbindungen in flüchtigere Derivate umwandeln, um sie auf diese Weise für die GC zugänglich zu machen.^{124,125} Parallel sollte ein passender Linker für die Analyse der Fettsäurehydroxamaten unter Verwendung von LC-MS, insbesondere HR-MS, synthetisiert werden (Abbildung 11).

Im Vergleich zur GC ist die HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ein leistungsfähiges Werkzeug zur Bestimmung hochpolarer Verbindungen in verschiedenen Matrizen. Sie gehört zu der am weitesten verbreiteten analytischen Technik in der pharmazeutischen Industrie. Jüngste technologische Fortschritte in der Massenspektrometrie (MS) wie die Kombinationen von hoher Massenauflösung, hohe Massengenauigkeit, schnellere Scan-Zeiten und quantitative Reproduzierbarkeit in relativ erschwinglichen und einfach zu bedienenden Instrumentierungen, haben

die HR-MS in der Lipidomik bereits vorangetrieben. Die Kombination von Flüssigchromatographie (LC), gepaart mit hochauflösender (HR)-MS, erleichtert nicht nur die Trennung mehrerer Lipidklassen, sie liefert gleichzeitig quantitative und qualitative Informationen. HR-Instrumente können dabei Ionen mit nominaler Masse auflösen, wobei sie eine Massenaufösungen von 60.000 oder mehr erreichen, während ebenfalls eine exakte Massenmessungen auf fünf Teilen pro Millionen (ppm) durchgeführt werden kann.¹²⁶ Eben diese Empfindlichkeit und Genauigkeit bietet das Potenzial, Lipidomik Analysen in der Zukunft noch weiter voranzutreiben und macht diese Methode zu einer geeigneten Wahl für die Charakterisierung und Analyse der Diversität in Lipidzusammensetzungen S-acylierter Proteine.

Für die Realisierung des Pentafluorbenzyl-Linkers (Abbildung 10) wurde Ethylen Bromid zu einer Lösung aus *N*-Hydroxyphthalimid in DMF und Triethylamin gegeben und das Gemisch für 65 °C für fünf Stunden und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das weiß-gelbliche Präzipitat (1,2-Bis(Phthalimidooxy)ethan) wurde in einem Gemisch aus Essigsäure und 48%-iger Bromwasserstoffsäure gelöst und bei 120 °C für 1.5 Stunden gerührt. Nach Rekristallisation konnte das Dioxyamin (1) mit dem Pentafluorobenzaldehyd tropfenweise umgesetzt werden. Der finale Pentafluorobenzyl-Linker (2) konnte mit einer Ausbeute von 58 % erhalten werden (Abbildung 10).

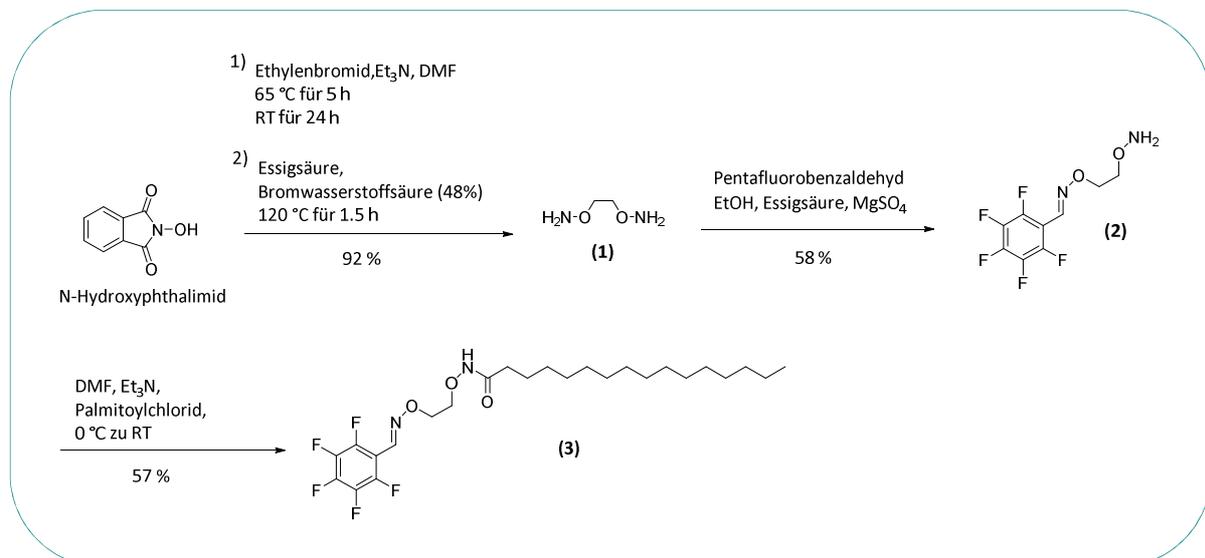


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Synthese des Pentafluorobenzyl-Linkers und dessen Palmitoyl-Derivates zur späteren Analyse mittels GC-MS.

Für die spätere Referenzmessung wurde ebenfalls der palmitoylierte Linker (3) benötigt. Dazu wurde das Palmitoylchlorid mit einer Ausbeute von 57 % an den Pentafluorobenzyl-Linker gebunden (Abbildung 10). Parallel wurde ein passender Linker für die HPLC-Analysen synthetisiert. Dazu wurde Kalium Phthalimid zu einer Lösung aus einem Chloro-Ketal in DMF gegeben und die Reaktion wurde über Nacht refluxiert. Das Rohprodukt wurde in Ethanol gelöst und nach Zugabe des Hydrazins konnte das Aminoketal (4) isoliert werden. Durch den Umsatz mit Fluoresceinisothiocyanat wurde dieses in das Boc-geschützte, fluoreszenz-markierte Aminoketon überführt. Nach der Entschützung wurde das Keton (5) langsam zum Dioxyamin (1) gegeben und der HPLC-Linker (6) konnte mit einer Ausbeute von 55 % erhalten werden. Die Synthese der Referenzprobe (7) erfolgte erneut durch Anbringung des Palmitoylchlorid mit einer Ausbeute von 27% (Abbildung 11).

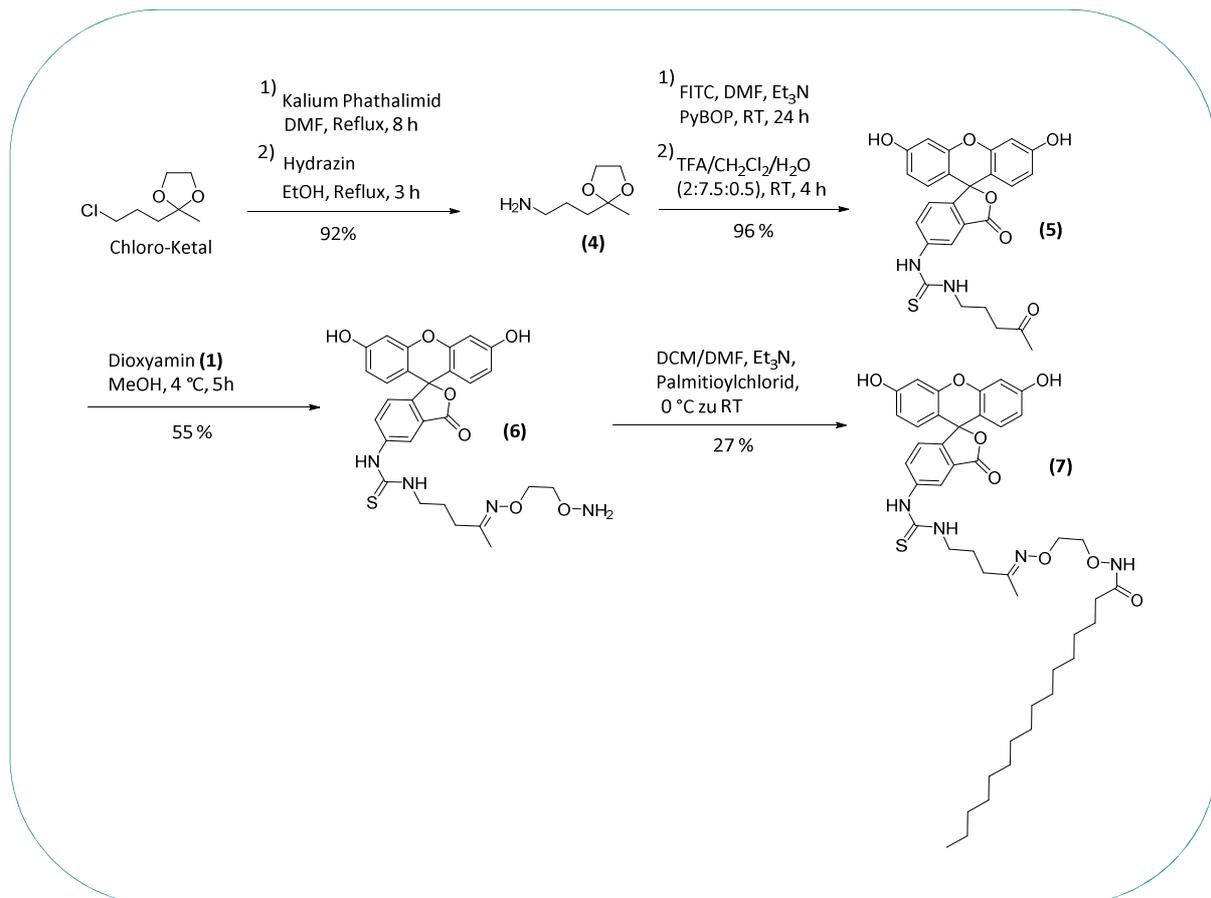


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Synthese des HPLC-Linkers und dessen Palmitoyl-Derivates zur späteren Analyse mittels HPLC-MS.

Allerdings zeigten sich in ersten Testläufen Instabilitäten beider Linker. Diese ergaben sich sehr wahrscheinlich aus der Anwesenheit des Imins in den besagten Linkern. Mehrere Versuche, diesen zu stabilisieren, scheiterten. Aus diesem Grunde wurden drei weitere Linker parallel synthetisiert, die den Einbau unterschiedlichen Modifikationen ermöglichen sollten: ein FITC-markierter Linker (11) (Abbildung 12), der sowohl die Löslichkeit der Probe als auch die Sensitivität der Methode erhöhen sollte; ein Picolylamin-Linker (13) (Abbildung 13) und eine Triphenylphosphin-Linker (16) (Abbildung 14), welche eine leicht ionisierbare Gruppe besitzen, die eine verbesserte Detektion während der MS-Analyse ermöglicht. Ferner sind diese zwei Verbindungen dafür bekannt eine pM Detektion mittels HPLC-MS zu ermöglichen.^{127,128}

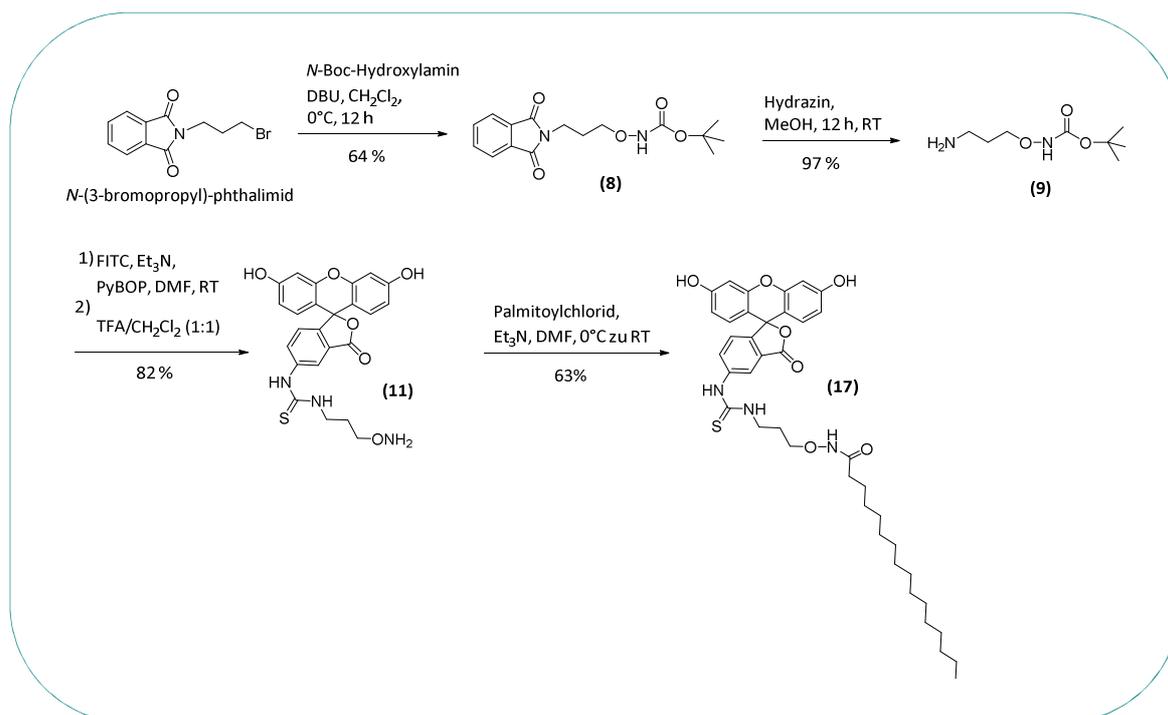


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Synthese des HPLC-FITC-Linkers und dessen Palmitoyl-Derivates zur späteren Analyse mittels HPLC-MS.

Um im ersten Schritt *N*-(3-Bromopropyl)-phthalimid mit einer säurelabilen Schutzgruppe zu schützen, wurde es zusammen mit *N*-Boc-Hydroxylamin gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von Diazabicycloundecen wurde die Reaktion für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Boc-geschützte Produkt (8) wurde in Methanol aufgenommen und mit Hydrazin umgesetzt. Nach der Zugabe von Fluoresceinisothiocyanat konnte der fluoreszenz-markierte Hydroxylamin-Linker (11) mit einer Ausbeute von 82 % erhalten werden (Abbildung 12). Die Isolation der Referenz (17) erfolgte mit einer Ausbeute von 63 %.

Parallel wurde mit der Synthese des Picolyamin-Linkers (13) (Abbildung 13) gestartet. Der Grundbaustein aller drei Linker, *N*-Boc-Hydroxylamin (9), wurde in Acetonitril gelöst und tropfenweise zum Anhydrid der Bernsteinsäure gegeben. Die entstandene Boc-geschützte Carbonsäure (12) wurde anschließend mit Picolyamin umgesetzt und das Produkt (13) konnte nach Entschützung der säurelabilen Schutzgruppe mit einer Ausbeute von 76 % erhalten werden. Die Isolation der Referenz (18) erfolgte mit einer Ausbeute von 17 %.

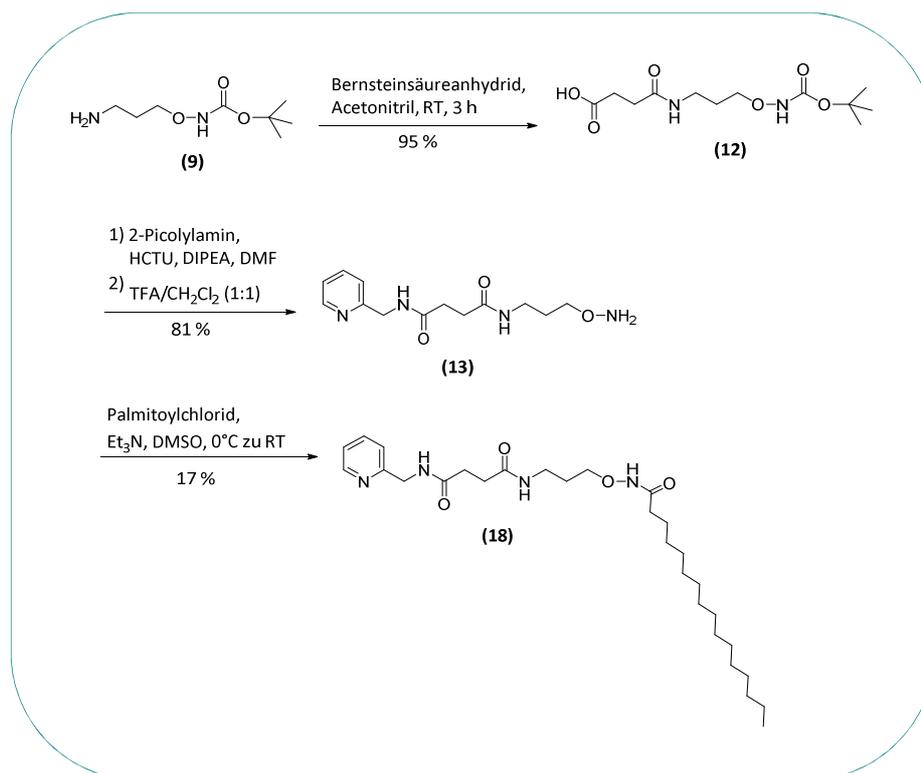


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Synthese des HPLC-Picolylamin-Linkers und dessen Palmitoyl-Derivates zur späteren Analyse mittels HPLC-MS.

Für die Synthese des dritten Linkers, dem Triphenylphosphin-Linker (16) (Abbildung 14), wurde Dicyclohexylcarbodiimid zusammen mit *N*-Hydroxysuccinimid zu einer Lösung aus Acetonitril und Triphenylphosphinbromid gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur ruhen gelassen und das Präzipitat konnte abschließend abfiltriert werden. Das Rohprodukt wurde in 100 mM Borat Puffer gelöst und zu einer Lösung aus (9) und 0.1 vol% Ameisensäure in Acetonitril gegeben.

Nach der Entschützung der Boc-Schutzgruppe konnte der Triphenylphosphin-Linker (16) mit einer Ausbeute von 96 % erhalten werden (Abbildung 14). Die Isolation der Referenz (19) erfolgte mit einer Ausbeute von 15 %.

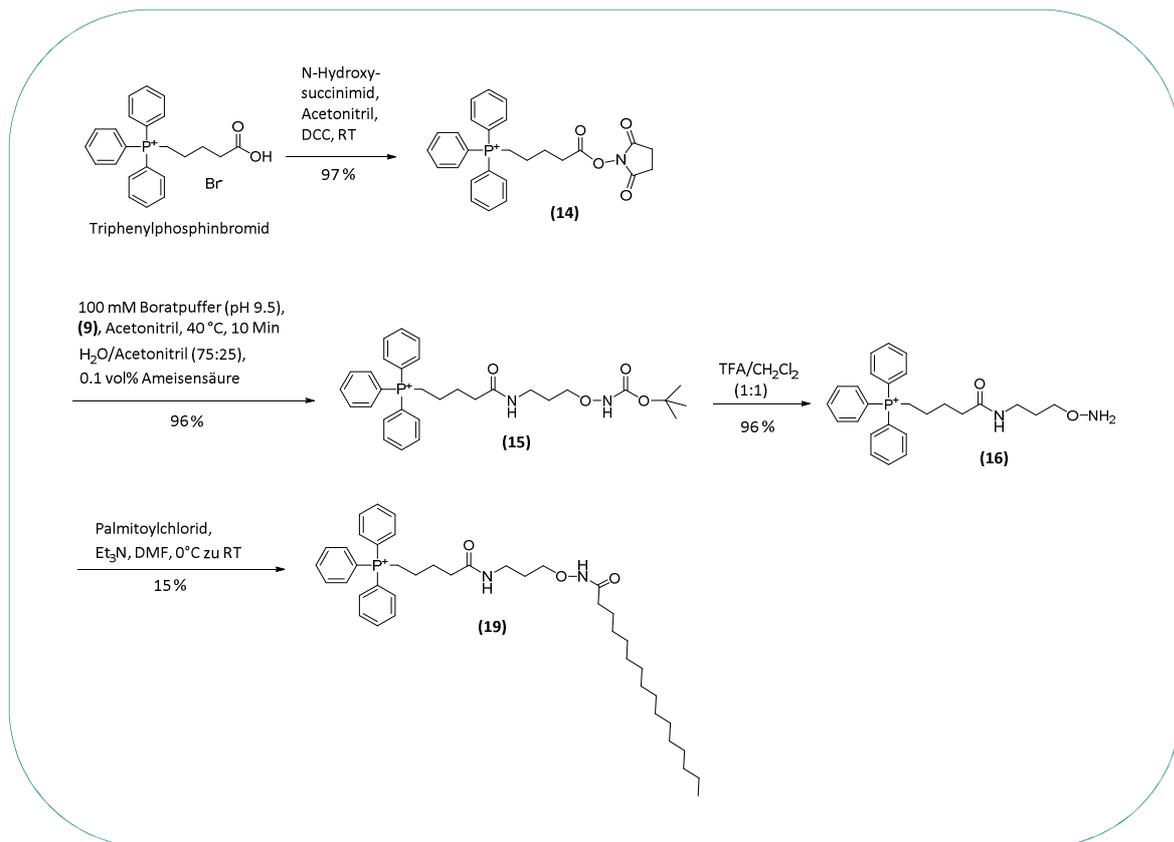


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Synthese des HPLC-Triphenylphosphin-Linkers und dessen Palmitoyl-Derivates zur späteren Analyse mittels HPLC-MS.

Alle nachfolgenden Tests sowie die zellbasierten Extraktionen und Analysen wurden mit dem FITC-Linker (11) durchgeführt, da es bereits bei der Synthese der Palmitoyl-basierten Referenzen der anderen Linker (Picolyli-/ Triphenylphosphin) zu Löslichkeitsproblemen kam. Der FITC-basierte Hydroxyl-Linker zeigte allerdings eine gute Löslichkeit und verfügt durch seine Fluoreszenzmarkierung über eine erweiterte Detektionsmöglichkeit, die in der Massenanalyse von Nutzen sein könnte.

4.2 Das Lipid-Extraktions-Protokoll

Wie bereits erwähnt, können Thioester selektiv durch die Behandlung mit neutralem Hydroxylamin gespalten werden, was zur Erzeugung eines freien Sulfhydryls und der Umwandlung der freigesetzten Fettsäure in Fettsäurehydroxamate führt, welche dann durch Massenspektrometrie analysiert werden können.

Um eine optimale Quantifizierung der Fettsäurehydroxamate zu gewährleisten, wurde eine Reihe von Hydroxamaten als Referenzverbindungen (Verbindungen 19-28) nach demselben Verfahren hergestellt, das für die Synthese des Palmitinsäurehydroxamats verwendet wurde (Abschnitt 10.8).

Zu diesen Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge und einem unterschiedlichen Sättigungsgrad gehörten: Lauryl (12:0), Myristoyl (14:0), Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1), Linol (18:2), Archin (20:0) und Arachidon (20:4).

Diese freigesetzten Fettsäurehydroxamate können in der hochaufgelösten Masse getrennt voneinander identifiziert und quantifiziert werden (Abbildung 15).

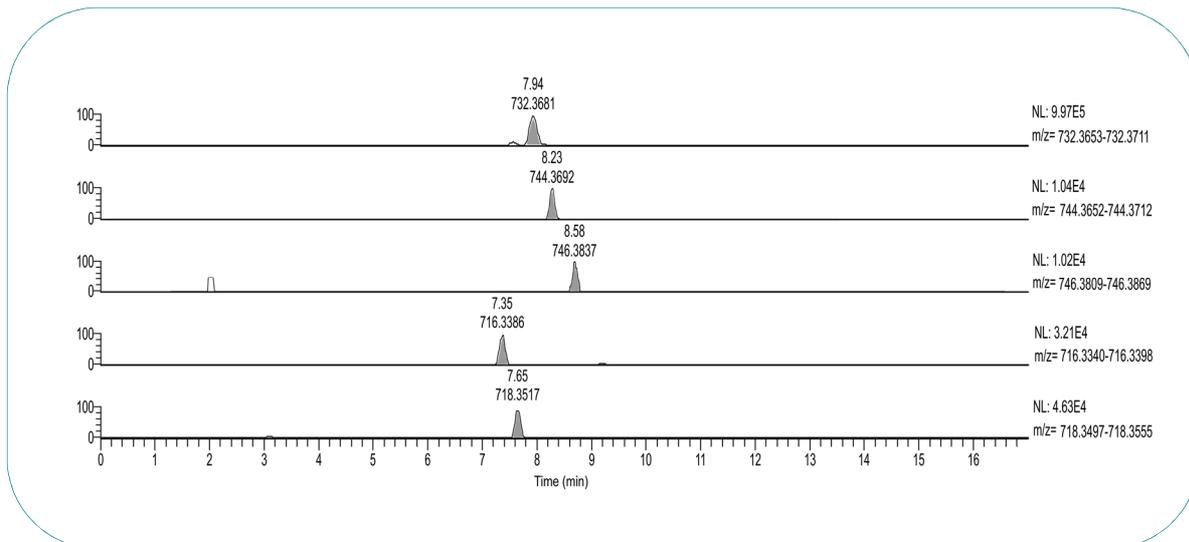


Abbildung 15: LC-MS Fenster ausgewählter Referenzen mit einem Massentoleranzfenster von 5 ppm. Von Oben nach unten: der interne Standard (C17:0), die Fettsäurehydroxamate: Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0) und Oleoyl (18:1).

Um Verluste von Probenbestandteilen oder auch andere systematische Fehler während der Probenvorbereitung oder der Analyse auszuschließen, wurde die nicht-natürliche Heptadecansäure (C17:0) nach Abschnitt 10.8 synthetisiert und sollte als Interner Standard eingesetzt werden. Diese Substanz ist eine probenfremde Komponente, die dem Analyten (hier: Referenzen 19-28) chemisch ähnlich ist und so als Bezugsgröße für die spätere Quantifizierung dienen kann. Sie wird dazu in bekannter Konzentration zu jeder Probe hinzugefügt. Dabei wird angenommen, dass sich die Konzentration der Analyten in gleicher Weise verändert wie die des internen Standards.

Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung eines Internen Standards (IS) ist dabei ein lineares Verhältnis der Komponenten. Aus diesem Grunde wurden serielle Verdünnungsreihen (25-0.01 pmol, 5-0.001 μM) von vier ausgewählten Referenzen (Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1)) und des IS erstellt und ihre Signalintensitäten gegen ihre Stoffmenge aufgetragen (Anhang, Abbildung 74). Nachdem die Linearität und Robustheit unter Verwendung von extrahierten Ionen Chromatogrammen mit einem Massentoleranzfenster von 5 ppm bestätigt werden konnten, wurden anschließend die Kalibrierfunktionen dieser vier Referenzen (19-22) erstellt.

Für die Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden abermals serielle Verdünnungsreihen (25-0.01 pmol, 5-0.001 μM) der vier ausgewählten Analyten (Referenzen 19-22) erstellt, die diesmal mit derselben Menge des IS (C17:0, 25 pmol) versehen waren. Jeweils zwei Signale (Analyt und IS) wurden nunmehr simultan in der hochaufgelösten Masse gemessen und für die Berechnung der Kalibrierfunktion genutzt.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe dieser erstellten Analysefunktionen. Im Detail wurde die Fläche des Chromatogrammsignals des Internen Standards und des jeweiligen Analyten integriert und mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt¹²⁹:

$$\text{pmol}_A = \text{pmol}_{IS} \times (A_A/A_{IS})/m \quad (\text{Gleichung 01})$$

Wobei A für Analyt und IS für den Interner Standard C17:0 steht; A_A die Signalfläche des Analyten und A_{IS} die Signalfläche des Internen Standards C17:0 angibt; m steht für die Steigung der Kalibriergeraden.

Letztendlich dient das Verhältnis der relativen Intensitäten der Referenz gegenüber dem Signal des IS als analytischer Parameter (Anhang, Abbildung 75). Die Nachweisgrenze (*LOD*) und die Quantifizierungsgrenze (*LOQ*) wurden dabei als 3-facher bzw. 10-facher Wert der Standardabweichung des Untergrundsignals bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Nachweisgrenze (*LOD*) und Quantifizierungsgrenze (*LOQ*) der Referenzen Lauryl (12:0), Myristoyl (14:0), Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1), Linol (18:2), Archin (20:0) und Arachidon (20:4).

Referenz	LOD [pmol]	LOQ [pmol]
Palmitoyl (C16:0), (19)	0.0371	0.1124
Palmitolein (C16:1), (20)	0.0360	0.1090
Stearyl (C18:0), (21)	0.0422	0.1280
Oleyl (C18:1), (22)	0.0557	0.1687
Nonadecan (C19:0), (24)	0.0451	0.1322
Lauryl (C12:0), (26)	0.0382	0.1130
Myristoyl (C14:0), (25)	0.0341	0.1022
Arachin (C20:0), (27)	0.0537	0.1748
Arachidon (C20:4), (28)	0.0552	0.1673

Es konnte gezeigt werden, dass die freigesetzten Fettsäurehydroxamate getrennt identifiziert und quantifiziert werden können. Dabei zeigte sich eine untere Nachweisgrenze von ungefähr 0.05 pmol für die hier getesteten Referenzen.

In einem Testexperiment sollte weiter untersucht werden, ob dieses analytische Verfahren auch zur Identifizierung und Quantifizierung *S*-verknüpfter Fettsäuren unbekannter Konzentration verwendet werden kann. Dazu sollte ein Fmoc-geschütztes, palmitoyliertes Cystein (29) mit unterschiedlichen Konzentrationen des synthetisierten FITC-Linkers (11) inkubiert und die Freisetzung des Fettsäurehydroxamats mittels Massenspektrometrie überprüft werden.

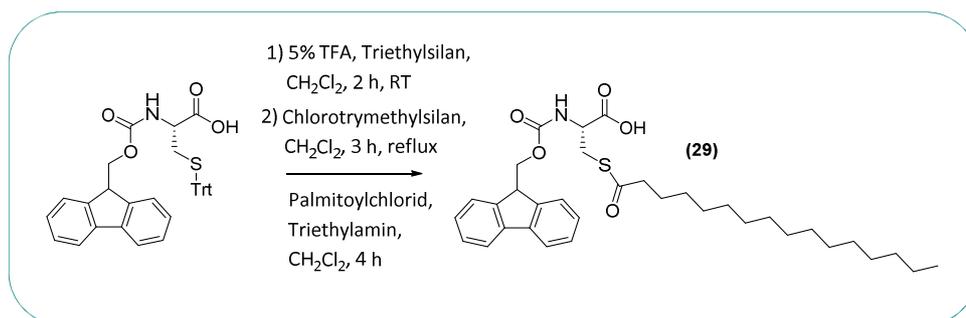


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Synthese des Fmoc-geschützten Palmitoyl-cysteins.

Für die Synthese des palmitoylierten Cysteins (29) wurde zuerst die Trityl-Schutzgruppe des Fmoc geschützten Bausteins durch Zugabe von Trifluoressigsäure und Triethylsilan entfernt. Das Zwischenprodukt wurde mit Chlorotrimethylsilan umgesetzt und für 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend mit Palmitoylchlorid und Triethylamin über 4 Stunden durch langsame Zugabe des Gemisches umgesetzt. Der palmitoylierte Baustein (29) wurde mit einer Ausbeute von 68 % erhalten.

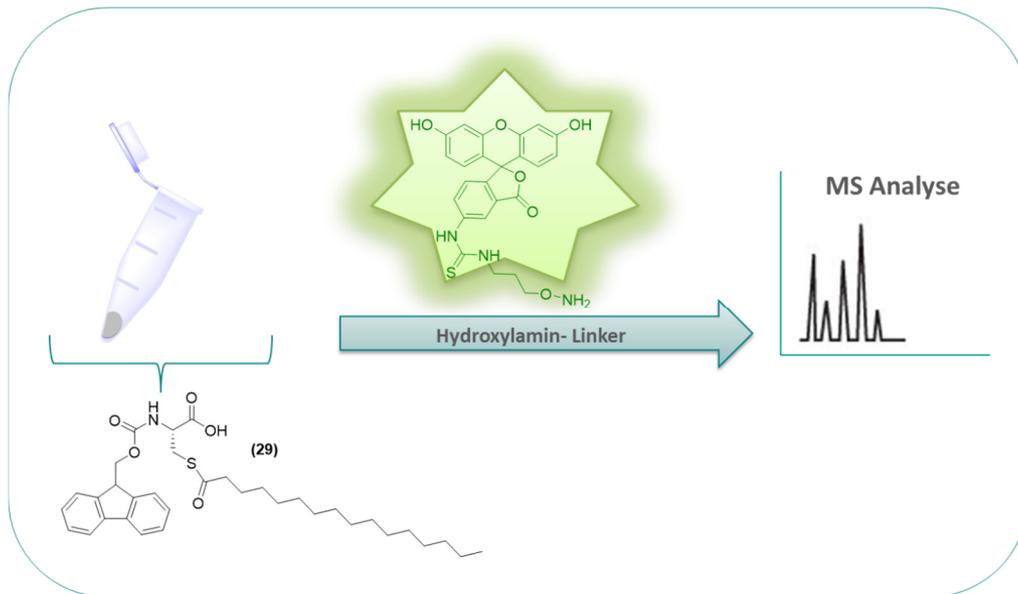


Abbildung 17: Test des FITC-Linkers. Der synthetisierte Baustein (29) wurde in DMSO gelöst und mit dem Linker inkubiert. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels Massenspektrometrie kontrolliert.

Für den Test wurden (5 mM, 25 nmol) des Fmoc-geschützten, palmitoylierten Cystein-Bausteins (29) (Abschnitt 10.8) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hydroxylamin-Linkers (50 - 3.75 pmol, 10 - 0.75 μ M) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 10 μ L des Internen Standards C17:0 (0.5 nmol) hinzugegeben, die Proben getrocknet und an der hochaufgelösten Masse analysiert.

Die Quantifizierung erfolgte, wie bereits beschrieben, mit Hilfe der erstellten Analysefunktionen und Gleichung 01.

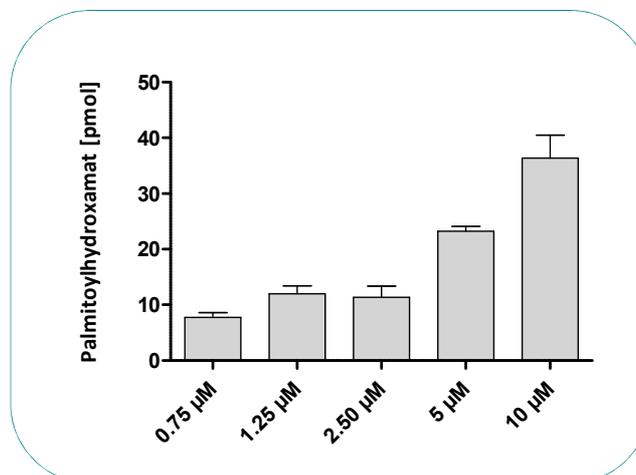


Abbildung 18: Quantifizierung des Palmitoylhydroxamatgehaltes nach der Lipidextraktion mit verschiedenen Konzentrationen des FITC-ONH₂-Linkers (11). Mittelwert \pm SD (n = 5).

Wie sich zeigte, konnte der synthetisierte Hydroxylamin-Linker (11) den Thioester des palmitoylierten Bausteins (29) spalten, und das freigesetzte Palmitoylhydroxamat konnte erfolgreich durch die Massenspektrometrie analysiert werden.

Zusammenfassend lässt sich bis hierhin sagen, dass S-verknüpfte Fettsäuren durch den FITC-Linker (11) gespalten werden können und dass die freigesetzten Fettsäurehydroxamate mit Hilfe der HR-MS getrennt identifiziert und auch quantifiziert werden können. In den weiteren Abschnitten sollte nun untersucht werden, ob dieses Verfahren auch zur Identifizierung endogener S-Acylketten verwendet werden kann.

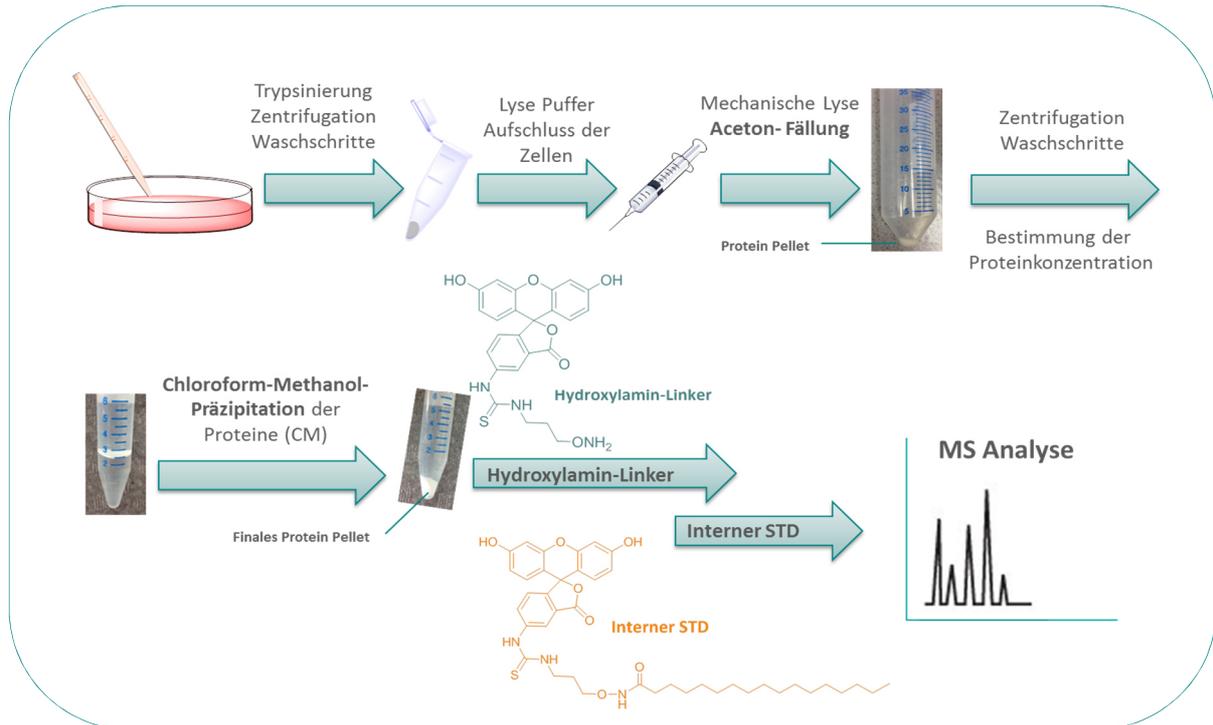


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Lipid-Extraktions-Protokolls.

Für die Lipid-Extraktion wurden die Zellen in einem ersten Schritt geerntet, mit Lysepuffer lysiert und die Proteine durch Zugabe von kaltem Aceton ausgefällt (Abbildung 19). Nach mehreren Waschschriffen wurden die nicht-kovalent gebundenen Lipide unter Verwendung der Chloroform-Methanol-Fällung extrahiert. Nach der Inkubation mit dem Linker und der Zugabe des Internen Standards erfolgte in jedem Fall die Untersuchung der Proben mittels HR-MS-Analyse (Abschnitt 10.6.2).

4.3 Analyse des gesamten Zelllysates

In einer ersten Studie sollten das Proteom von HEK293-, HeLa- und N2a-Zellen hinsichtlich ihrer Lipidmuster verglichen werden. HEK293 Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die in der Zellbiologie seit Jahren als einfach zu händelnde Zelllinie eingesetzt werden.¹³⁰ HeLa-Zellen (Henrietta Lacks) sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Sie wurden aus den Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) gewonnen. Die dritte Zelllinie ist eine schnell wachsende Maus-Neuroblastom-Zelllinie, die kurz N2a (Neuro-2a-Zellen, ATCC®CCL-131™)¹³¹ genannt wird. Sie werden vor allem zu Studien von Neurotoxizität, Alzheimer-Krankheiten und asymmetrischen Zellteilungen eingesetzt.

Zu diesem Zweck wurde das Proteom von HEK293, HeLa und Neuro 2A (N2a)-Zellen wie oben beschrieben ausgefällt und die Lipide, die nicht-kovalent mit Proteinen assoziiert waren, wurden durch Waschen der Proteinpellets mit Chloroform/ Methanol entfernt (Abbildung 19). Die freigesetzten Fettsäurehydroxamate wurden extrahiert und mittels HR-MS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte, wie bereits beschrieben, mit Hilfe der erstellten Analysefunktionen und Gleichung 01. Die Identität der gebildeten Fettsäurehydroxamate wurde durch eine genaue Masse und elementare Zusammensetzung eindeutig identifiziert und durch Vergleich ihrer Retentionszeit mit denjenigen, die mit den synthetisierten Referenzverbindungen beobachtet wurden, bestätigt.

Alle Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Jede Probe wurde in dreifacher Bestimmung gemessen und jeder Versuch wurde mindestens 5-mal wiederholt.

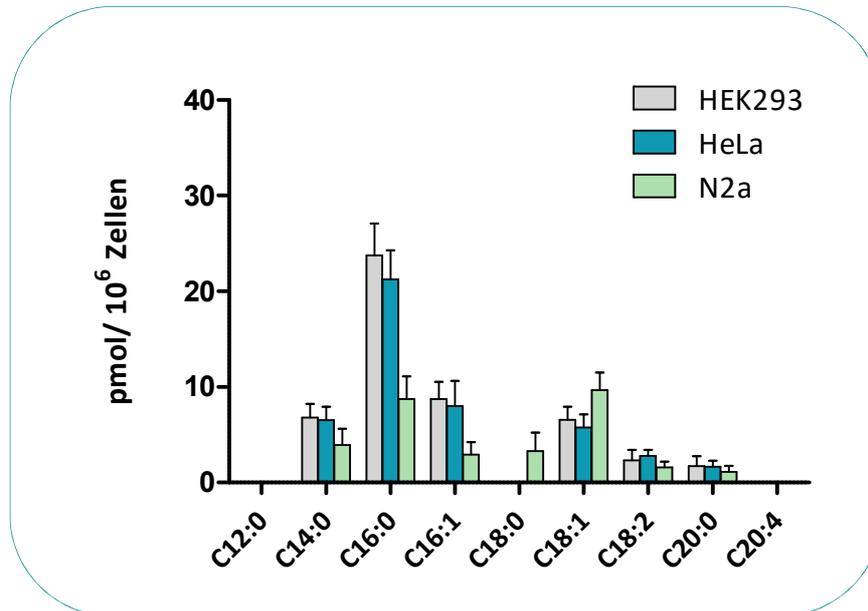


Abbildung 20: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der Zelllinien: HEK293, HeLa und N2a. Mittelwert \pm SD (n = 5).

Nach der Quantifizierung der extrahierten Fettsäurehydroxamate zeigten sich eine gewisse Diversität der Fettsäurezusammensetzung sowie wesentliche zelltypspezifische Unterschiede (Abbildung 20). In HEK293- und HeLa-Zellen waren die häufigsten Proteine mit Palmitin-, Palmitolein-, Myristoyl- und Oleinsäuren S-acyliert. Im Gegensatz dazu enthalten N2a-Zellen geringere Anteile von Palmitin- und Palmitoleinsäure, wohingegen die in diesen Zellen nachgewiesene Menge an Stearin- und Oleinsäuren deutlich höher war als der anderen zwei Zelllinien. In allen Fällen konnten nur geringe Mengen der Arachin- und Linolsäure beobachtet werden, während kein Signal der Modifikation mit Laurin- und Arachidonsäure nachgewiesen werden konnte (Abbildung 20).

4.3.1 Validierung der Methode

Die Validierung der Methode sowie die Spezifität des FITC-Linkers und der bisher erzielten Ergebnisse sollte in zwei unabhängigen Experimenten getestet werden. Im ersten Experiment wurde ein kommerziell erhältlicher Inhibitor der DHHCs oder PATs (Protein Acyltransferasen) eingesetzt (Abschnitt 10.6.3). Proteinacyltransferasen (PATs), die für die Synthese von S-acylierten Proteinen verantwortlichen Enzyme sollten durch die Behandlung der Zellen mit 2-Bromopalmitat (2-BP) gehemmt werden. In einem zweiten Versuch wurden die Zellen vor der Ernte mit einer nicht-natürlichen C-19 Fettsäure behandelt und deren Aufnahme überprüft (Abschnitt 10.6.4).

4.3.1.1 Inhibition mit 2-Bromohexadecansäure

2-BP, ist ein bekannter Inhibitor der DHHCs oder PATs (Protein Acyltransferasen), der bereits eine breite Anwendungen in der Blockierung der Palmitolierung von Proteinspezies gefunden hat.⁵⁹ Zu erwarten war, dass bei der Behandlung mit 2-BP die Proteine nicht mehr acyliert werden können, so dass nach der Lipidextraktion keine Massen acylierten Proteine gefunden werden sollten. Ist dies der Fall, ist die Methodik verlässlich und die Detektion andere Lipidarten, wie Membranlipide beispielsweise, kann ausgeschlossen werden.

Die Zellen wurden mit 50 μM 2-BP über 30 Minuten inkubiert und dem Extraktionsprotokoll unterzogen. Wie in dem Ionen Chromatogramm mit einem Massentoleranzfenster von 5 ppm (Abbildung 21) zu sehen ist, konnte neben dem Internen Standard kein weiteres Massensignal für die gesuchten Lipide gefunden werden (Abschnitt 10.6.3). Dies ist ein direkter Beweis dafür, dass der FITC-Linker spezifisch auf die S-Acyلكetten der Proteine wirkt.

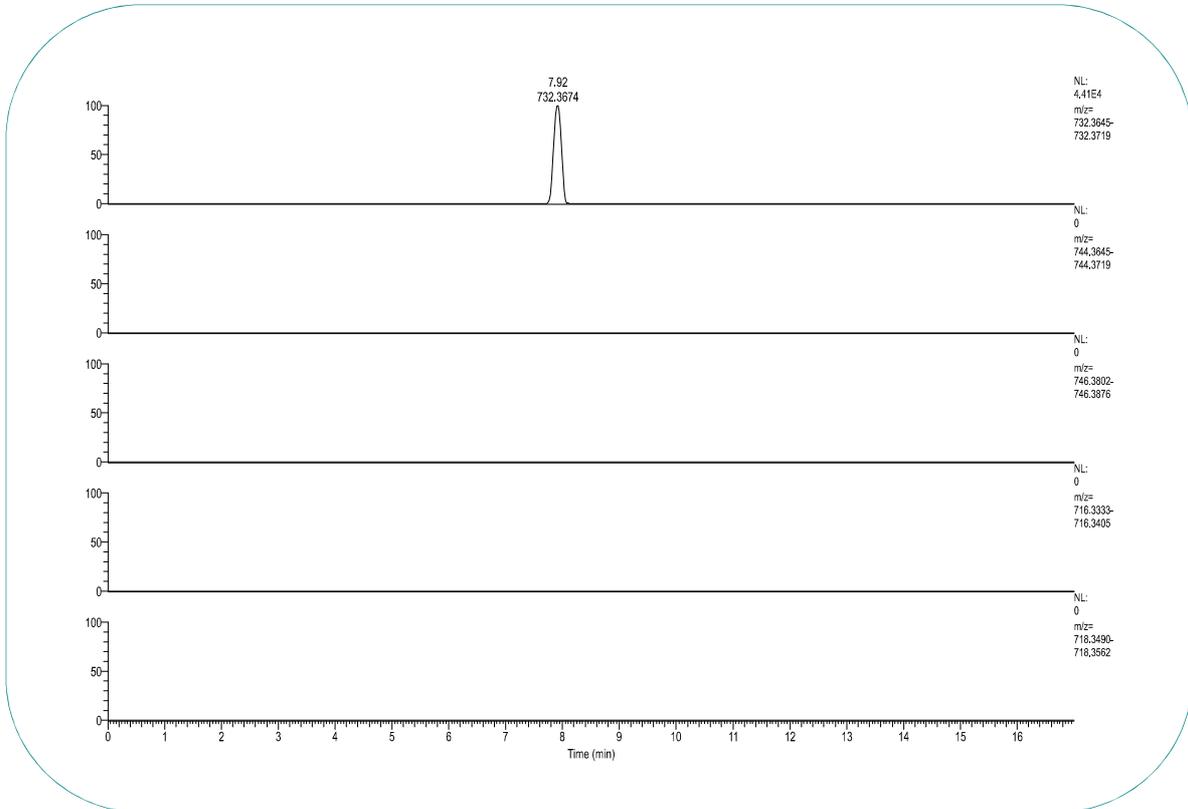


Abbildung 21: Repräsentativer Ausschnitt aus der Massenanalyse der HEK293-Zellen nach Inkubation mit 2-Bromohexadecansäure. Von Oben nach Unten: Massensignal des Internen Standards, des Ölsäure-, des Stearinsäure-, des Palmitoleinsäure- und des Palmitinsäure-Hydroxamats im positiven Esi-Modus.

Es ist klar zu erkennen, dass nur das Massensignal des Internen Standards einen Ausschlag zeigt, wohingegen die Signale der anderen Acylierten-Lipide keinen quantifizierbaren Wert aufwiesen. Die Inkubation mit 50 μM des 2-BP-Inhibitors über 30 Minuten war also ausreichend, um eine Acylierung der Proteine innerhalb der Zelllysate mit den gesuchten Lipidresten zu unterbinden.

4.3.1.2 Inkubation mit der nicht-natürlichen Nonadecansäure

In einem zweiten Validierungsschritt sollte untersucht werden ob, nicht-natürliche Fettsäuren in die Zellen aufgenommen und durch den etablierten Assay nachgewiesen werden können. Um die nicht-natürliche Fettsäure C-19 in die Zellen zu inkorporieren, wurden HEK293-, HeLa- und N2a-Zellen für 48 Stunden mit 400 μM der Fettsäure inkubiert und diese mittels Lipidextraktion analysiert (Abschnitt 10.6.4).

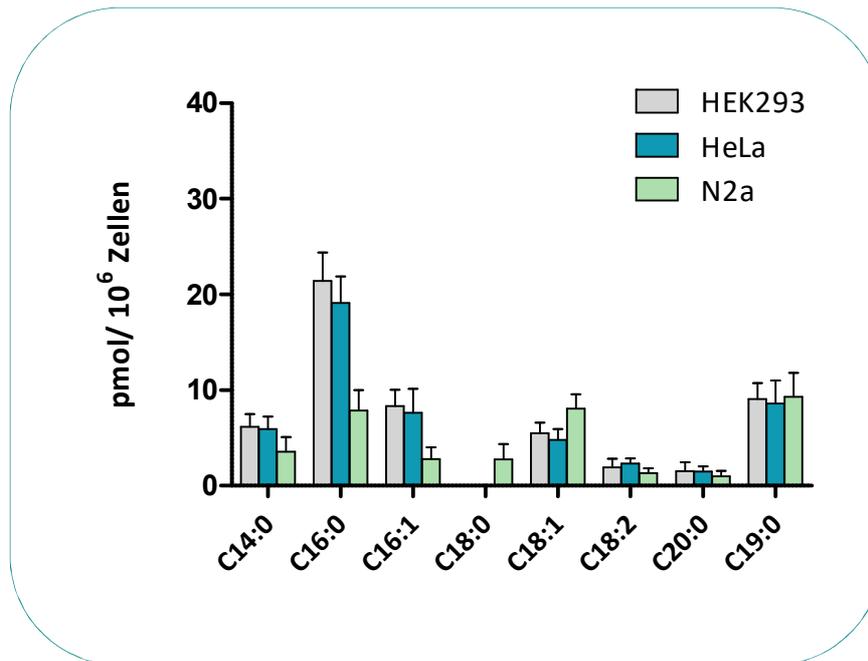


Abbildung 22: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der Zelllinien: HEK293, HeLa und N2a nach der Inkubation mit der nicht-natürlichen Fettsäure C-19. Mittelwert \pm SD (n = 5).

Es zeigte sich, dass nach der Inkubation der Zellen mit der nicht-natürlichen Nonadecansäure (C19:0), das entsprechende Fettsäurehydroxamat in allen drei getesteten Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22). Begleitet wurde diese Aufnahme von einer leichten Abnahme der Menge aller anderer Thioester-verknüpften Fettsäuren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der gewählte FITC-Linker ein gutes Werkzeug ist, um die Fettsäuren acylierter Proteine des gesamten Zelllysates zu analysieren.

4.4 Immunopräzipitation markierter Ras-Proteine

Ermutigt durch die hohe Empfindlichkeit der bisherigen Studien, sollte das Konzept auf die Analyse von Fettsäuren ausgewählter acylierter Proteine angewendet werden. Als Testprotein wurde die kleine GTPase N-Ras ausgewählt. Mit diesem Ziel wurden HEK293- und N2a-Zellen mit einem Vektor, der HA-N-Ras bzw. eGFP-N-Ras trägt, stabil transfiziert.

4.4.1 Stabile Transfektionen mit dem Amaxa Nucleofector®

Die Möglichkeit, Gene stabil in das Genom von Säugetierzellen zu integrieren, hat einen wichtigen Einfluss auf viele biomedizinische Forschungsbereiche sowie für die Entwicklung von pharmazeutischen Produkten. Während die transiente Transfektion für die schnelle Analyse von Genen und kleinen Proteinprodukten ausreicht, haben stabile Transfektionen den Vorteil, eine gesicherte, langfristige und reproduzierbare Genexpression zu ermöglichen. Dabei wird die stabile Expression des gewünschten Proteins durch eine stabile Integration des Gens in die Zielzelle des Chromosoms erreicht. In einem ersten Schritt wird das jeweilige Gen in die Zelle eingeführt, wo es in den Kern gelangt und schließlich in die chromosomale DNA integriert wird.

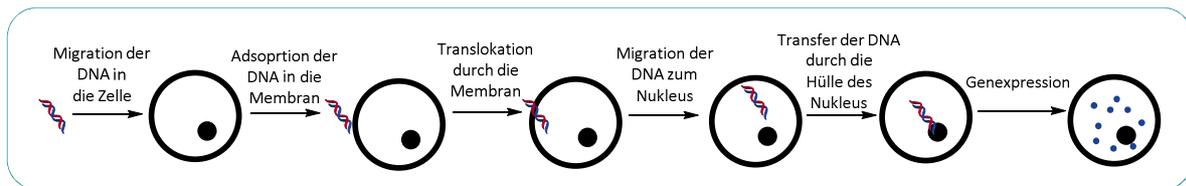


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Transfektion.

Allgemein kann eine stabile Expression durch zwei Faktoren beeinflusst werden: durch das verwendete Transfektionsverfahren und durch den Vektor, der das eigentliche Gen enthält. Die Transfektion selbst legt fest welcher Zelltyp für die stabile Integration genutzt werden kann. Während viele die Lipofektion mit Reagenzien für die Transfektion von DNA in adhärenenten Zelllinien nutzen, ist eine effiziente Einlagerung der betreffenden DNA schwierig und lässt sich oft nur durch virale Methoden oder durch Nucleofektion[®] wirklich erreichen. Leider muss man besonders bei den viralen Methoden den hohen Zeitaufwand zur Herstellung von Vektoren sowie erhöhte Sicherheits-Maßnahmen bedenken.

Bisher ist die Methode der Nucleofektion[®] das einzige nicht-virale Verfahren zum effizienten Einführen von DNA-Molekülen in den Kern nahezu jeden Zelltyps.

Stabil transfizierte Zellen können auf verschiedene Weise selektiert und kultiviert werden. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf den Einsatz sogenannter Selektionsmarker, da die hier verwendeten Plasmide Resistenzen gegen G-418 bzw. Hygromycin B besaßen.

4.4.2 Stabile Transfektion von HA-N-Ras und eGFP-N-Ras

Um HA-N-Ras stabil in HEK293-Zellen und eGFP-N-Ras in N2a-Zellen zu transfizieren, wurde das Amaxa Nucleofektions[®]-System (Abschnitt 4.4.1) verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde durch Messung der Genexpression durch Echtzeit-quantitative PCR (qPCR) bestimmt (Abbildung 24) und eine Westernblot-Analyse wurde verwendet, um die relative Expression des transfizierten Proteins unter Verwendung von Anti-Tubulin als interne Kontrolle zu bestimmen (Abbildung 25).

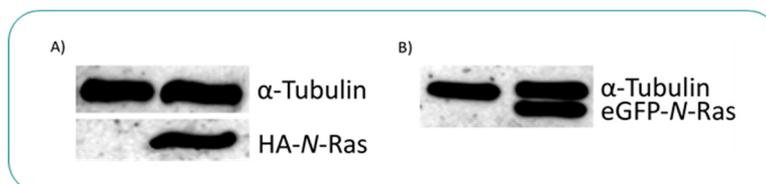


Abbildung 24: Westernblot der Überexpression. A) α-Tubulin und Anti-HA-Antikörper. B) α-Tubulin und Anti-eGFP-Antikörper.

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode, die Nukleinsäuren vervielfältigt und auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Dabei kann sie zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA durch einen Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green*) ermöglichen. Dazu wird während eines PCR-Zyklus in Echtzeit eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt, bei der die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Nach Beendigung des letzten Zyklus kann anhand der Fluoreszenzsignale eine Quantifizierung der PCR vorgenommen werden. Es gilt dabei zu beachten, dass nur in der exponentiellen Phase der PCR eine korrekte Quantifizierung möglich ist.

Im ersten Schritt wurde dazu die RNA in ihre cDNA umgeschrieben und der Prozess der zweistufigen RT-PCR (reverse Transkription und Echtzeit-PCR) durchgeführt (Abschnitt 10.6.4 und 10.5.4).

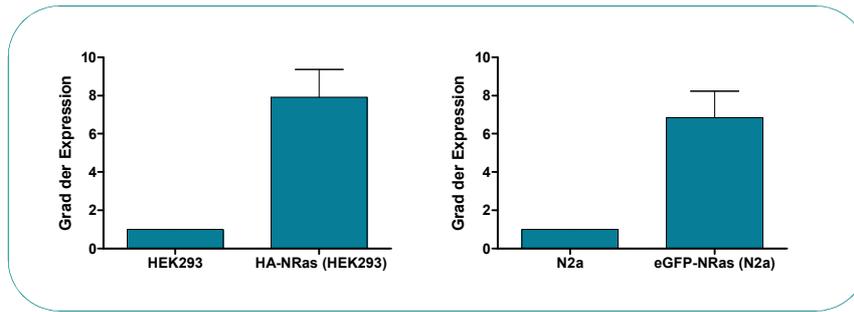


Abbildung 25: Auswertung der qPCR. Links: Ergebnisse des Grads der Überexpression für HA-N-Ras. Rechts: Ergebnisse des Grads der Überexpression für eGFP-N-Ras.

Dabei lag der Grad der Überexpression für die stabile Transfektion von HA-N-Ras in die HEK293-Zellen bei einem knapp 8-fachen Überschuss und bei der Transfektion des eGFP-N-Ras in die N2a-Zellen bei einem 7-fachen Überschuss (Abbildung 25). Darüber hinaus konnte eine direkte Identifizierung von N2a-transfizierten Zellen bei der mikroskopischen Visualisierung von eGFP-N-Ras erreicht werden (Abbildung 26).

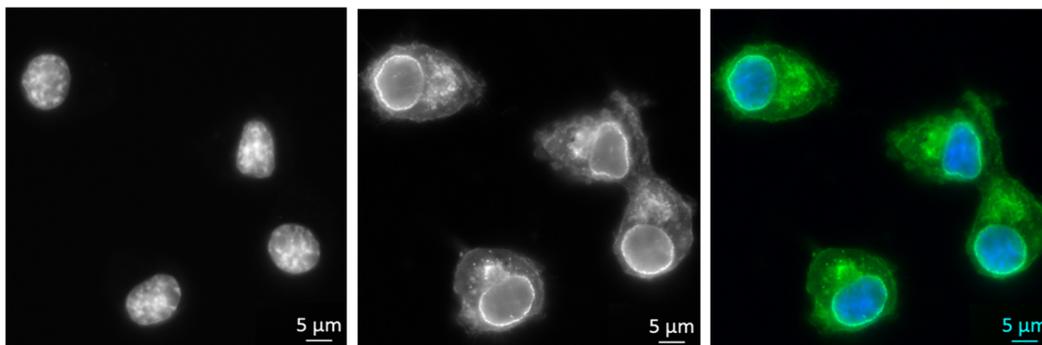


Abbildung 26: Stabile Transfektion von eGFP-N-Ras in N2a-Zellen. Links: DAPI gefärbter Nucleus (Blau); Mitte: Signal von eGFP-N-Ras (WGA-488, Grün); Rechts: Überlagerung der Kanäle. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop. Das Objektiv war ein 63x Öl-Immersion-Objektiv.

Auf den Bildern lässt sich klar die Färbung des Nucleus durch das Reagenz DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) erkennen. DAPI ist ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an die AT-reichen Regionen der kleinen Furche doppelsträngiger DNA anlagert. Mittig lässt sich deutlich die Lokalisation der Fluoreszenz markierten N-Ras am Golgi und an der Plasmamembran erkennen. Zusätzlich zeigt sich auch eine Lokalisierung um den Zellkern, was schon häufiger für N-Ras beobachtet wurde.

Nach den zwei erfolgreichen stabilen Transfektionen konnte mit der Immunpräzipitation der zwei N-Ras-Varianten begonnen werden.

4.4.3 Immunopräzipitation und Lipidextraktion der N-Ras-Varianten

Überexprimiertes N-Ras-Protein wurde durch Antikörper-Immunopräzipitation unter Verwendung von Anti-HA oder Anti-eGFP-modifizierter Agarose isoliert. Die handelsüblichen Anti-HA-Agarose-Kügelchen wurden genutzt, um das HA-markierte N-Ras aus der Gesamtheit der gelösten Proteine zu isolieren. Diese Agarose trägt einen hochspezifischen Maus IgG1 monoklonalen Antikörper der kovalent immobilisiert ist und dessen Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem menschlichen Influenza-Hämagglutinin (HA) Protein abgeleitet ist. Zur Isolierung des eGFP-markierten Proteins wurde das Lysat zuerst mit dem für eGFP spezifischen Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert und im Anschluss über Protein A/G Plus Agarose-Kügelchen gebunden. Diese Kügelchen bestehen aus gereinigtem Protein

A/G als rekombinantes Fusionsprotein, welches kovalent auf das 6 %-ige Agarosegranulat (CL-6B) aufgetragen wurde (Abschnitt 10.6.5).

Die an Agarose gebundenen Proteinfractionen wurden mit dem FITC-Linker inkubiert und die freigesetzten Fettsäurehydroxamate wurden, wie zuvor beschrieben, mittels HR-MS analysiert.

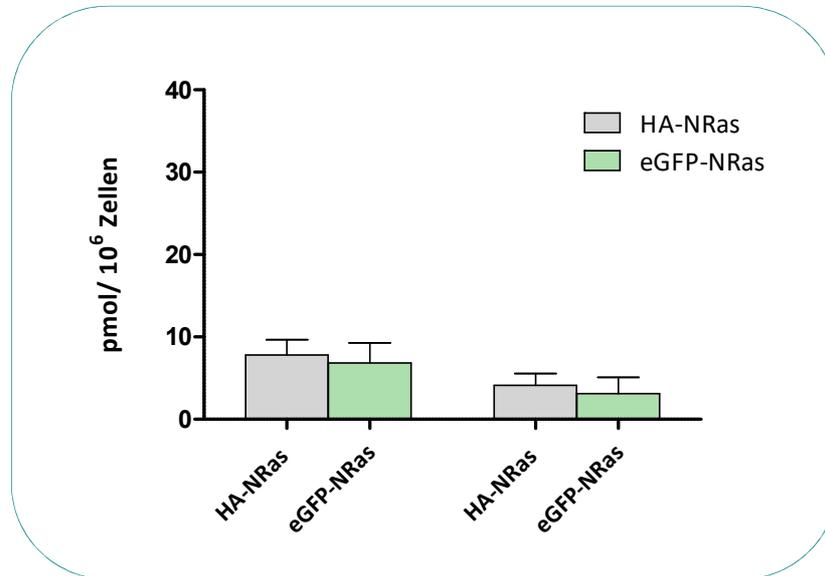


Abbildung 27: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion der Immunopräzipitation der zwei *N-Ras*-Spezies HA-*N-Ras* (HEK293) und eGFP-*N-Ras* (N2a). Mittelwert \pm SD (n = 5).

Die Ergebnisse zeigen, dass in beiden Zelllinien *N-Ras* sowohl mit Palmitinsäure (C16:0) als auch Palmitoleinsäure (C16:1) (Abbildung 27) zu 55% bzw. 45% modifiziert waren, während keine Spuren anderer Fettsäuren nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise scheinen auch beide immunopräzipitierten Proteine die gleiche Menge der detektierten Fettsäuren aufzuweisen.

Die entwickelte Methodik ermöglicht die effiziente Detektion *S*-verknüpfter Fettsäuren aus Zelllysaten und isolierten Proteinen. Dieser Ansatz könnte für die Entschlüsselung der pleiotropen Effekte von Inhibitoren der Proteinacylthioesterasen APT1 und APT2 von unschätzbarem Wert sein und ihre Substratspezifitäten charakterisieren. Um die Auswirkung dieser beiden Proteine auf Zellen zu untersuchen, sollten im Weiteren Inhibitoren auf des gesamte Zelllysate sowie auf das Modellprotein *N-Ras* getestet werden.

4.5 Auswirkungen durch APT-Inhibitoren

S-Acyl-Motive können in der Zelle durch die Wirkung von Thioesterasen abgespalten werden. Die Lysophospholipase 1 (LYPLA1, APT1) wurde als Palmitoyl-Thioesterase identifiziert, die beispielsweise für die Depalmitoylierung von Ras in Säugerzellen verantwortlich ist. Im Jahr 2010 wurden Studien der Cravatt-Gruppe durchgeführt, um Inhibitoren für diese Palmitoyl-Thioesterase sowie der strukturell verwandten LYPLA2 (APT2) zu identifizieren. Im Zuge dieser Versuche konnten zwei reversible Verbindungen ML348 und ML349 (Abbildung 28) als selektive LYPLA1 (APT1) und LYPLA2 (APT2)-Inhibitoren gefunden werden.⁷⁸ Die Strukturen der jeweiligen Verbindung sind in der folgenden Abbildung zu sehen.

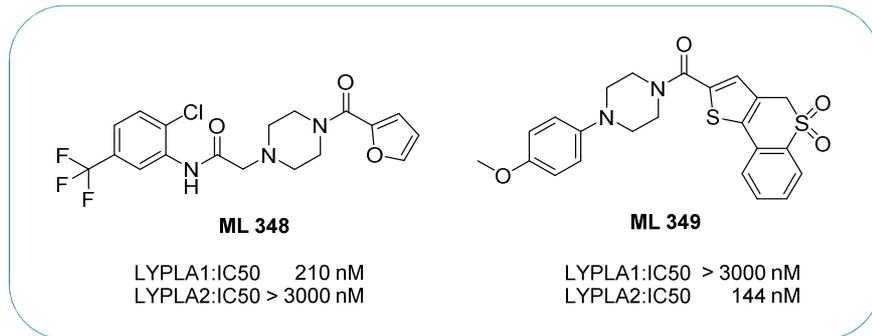


Abbildung 28: Strukturen der APT-Inhibitoren ML 348 und ML 349.⁷⁸

4.5.1 Untersuchung des gesamten Zelllysates

Obwohl wenig über die Substratspezifität beider Enzyme bekannt ist, haben neuere Studien gezeigt, dass APT1 in der Lage ist, Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von C10-C18 zu binden, die sowohl gesättigt sind oder auch eine Doppelbindung zwischen C9-C10 enthalten.¹³² Der entwickelte Ansatz könnte somit für die Entschlüsselung der pleiotropen Effekte von Inhibitoren der Proteinacylthioesterasen APT1 und APT2 von unschätzbarem Wert sein und ihre Substratspezifitäten charakterisieren. Es ist wenig bekannt über APT1- und APT2-Substratpräferenzen. Während sowohl APT1 als auch APT2 in vitro *N*-Ras depalmitoylieren können, ist die Umsatzzahl von APT2 für *N*-Ras zweifach höher als die für APT1.¹³³ Zudem wurde bisher nur durch eine APT2-Überexpression ein Einfluss auf die stationäre Lokalisation von acyliertem *H*-Ras gefunden.¹³⁴

Mit diesem Ziel wurde zuerst der Einfluss beider APT-Inhibitoren (ML348 und ML349) auf HEK293-Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten mit jeweils 30 μ M des jeweiligen Inhibitors inkubiert. Die Proben wurden nach der Extraktion wie beschrieben analysiert (Abschnitt 10.6.6).

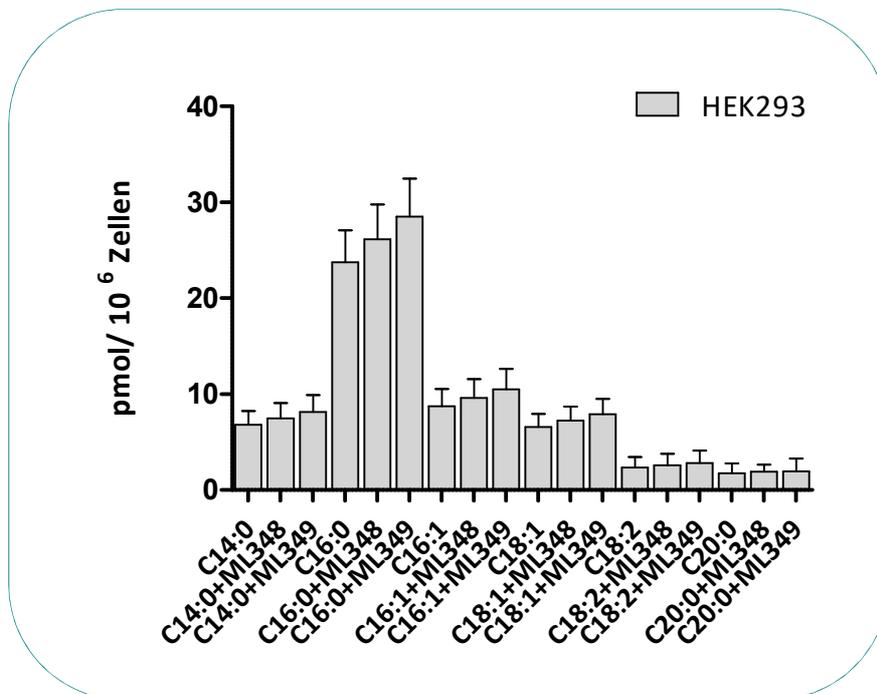


Abbildung 29: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der HEK293-Zellen nach der Inkubation mit jeweils 30 μ M des APT-Inhibitors ML 348, ML349 im Vergleich zum Fettsäuregehalt der Zelllinien ohne Inhibitor. Mittelwert \pm SD (n = 5).

In einem direkten Vergleich der zwei Inhibitoren zu der Gesamtheit der Fettsäuren aus den nicht behandelten HEK293-Zellen zeigten ML348 und ML349 eine ähnliche Auswirkung auf die Verteilung der Lipidreste innerhalb der Zellen (Abbildung 29). Die Menge an detektierter Fettsäure erhöhte sich dabei leicht in den Zellen, aber nicht statistisch signifikant. Diese Ergebnisse scheinen auf die Existenz einer weiteren zellulären Thioesterase, wie dem ABHD17 Protein, hinzuweisen, welches kürzlich bei der Depalmitoylierung von *N*-Ras identifiziert werden konnte.¹³⁵

4.5.2 Nach Immunopräzipitation

Um die Substratpräferenzen weiter zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuch die *N*-Ras-über exprimierenden HEK293-Zellen für 30 Minuten mit 30 μ M des jeweiligen Inhibitors inkubiert und die Lipide der immunopräzipitierten *N*-Ras-Proteine nach dem Lipidextraktionsprotokoll extrahiert und analysiert (Abschnitt 10.6.6 und 10.6.5).

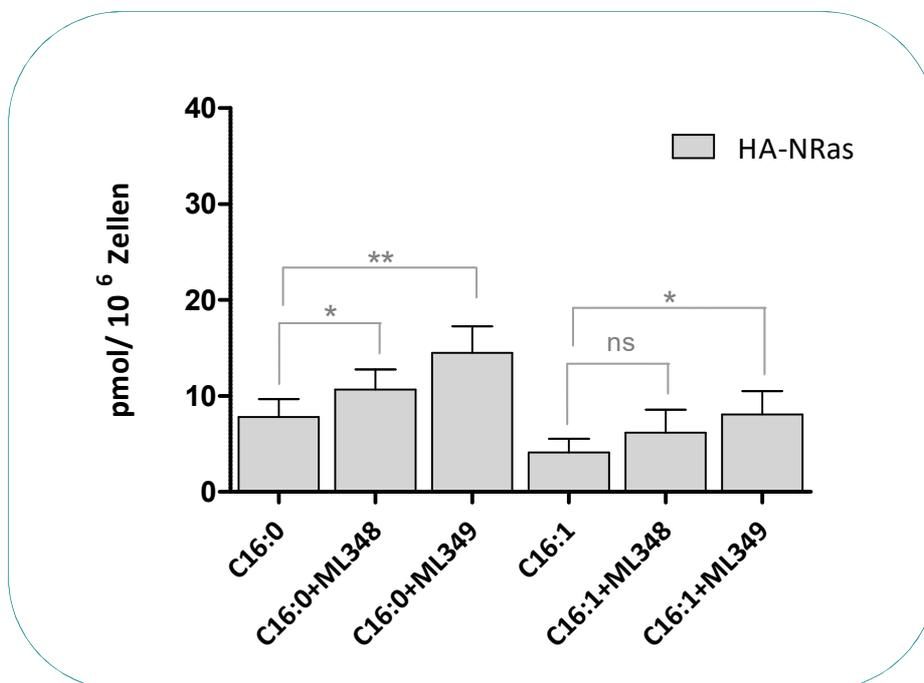


Abbildung 30: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion der Immunopräzipitation von HA-*N*-Ras (HEK293) nach der Inkubation mit jeweils 30 μ M des APT-Inhibitors ML 348, ML349 im Vergleich zum Fettsäuregehalt ohne Inhibitor. Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Nach der Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren zeigt sich, dass sich die Gesamtmenge der erfassten Säuren auch in den immunopräzipitierten Zellen erhöht hat. Insbesondere geht die Hemmung von APT2 mit einer signifikant höheren Zunahme der Fettsäurehydroxamate sowohl für die gesättigten, als auch für die ungesättigten C-16 Ketten einher. Die Ergebnisse zeigen, dass APT2 eine höhere Substratpräferenz für *N*-Ras im Vergleich zu APT1 zeigt. Allerdings kann auch die Anwesenheit von zusätzlichen Thioesterasen mit besserer Affinität für dieses Substrat nicht ausgeschlossen werden.

4.6 Auswirkungen durch SCD1-Inhibition

Ungesättigte Fettsäuren werden aus gesättigten Vorstufen mittels Fettsäure-Desaturasen wie der Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD1) synthetisiert, die eine cis-Doppelbindung an der Δ^9 -Position von Stearoyl und Palmitoyl-CoA zur Erzeugung von Oleoyl- und Palmitoleoyl-CoA einführen. Um die Rolle von SCD1 bei der Synthese von mit ungesättigten Fettsäuren modifizierten Proteinen zu erforschen,

sollten ferner HEK293- und HeLa-Zellen mit dem SCD1-Inhibitor CAY-10566 (Abbildung 32) vor der Analyse behandelt werden.

Es ist noch unklar, ob Proteine ihren Palmitoleinrest durch eine Acylierung ausgehend von Palmitolein-CoA erhalten oder ob eine Umwandlung bereits palmitoylierter Proteine durch Desaturasen erfolgt. Sollte diese Modifizierung durch Desaturasen erzeugt werden, könnte eine Inhibierung der APTs dazu führen, dass die Desaturasen genügend oder mehr Zeit für diesen Umwandlungsprozess haben.

Die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD), allgemein bekannt als Δ^9 -Desaturase, ist ein mikrosomales Enzym, das die Biosynthese von mono-ungesättigten Fettsäuren (MUFAs) aus gesättigten Fettsäuren (SFAs) katalysiert. Im Zuge der oxidativen Reaktion wird eine cis-Doppelbindung in die Fettsäure des modifizierten Acyl-CoA übertragen. Ihre bevorzugten Substrate sind Palmitoyl- und Stearoyl-CoAs, die zu Palmitoleoyl- und Oleoyl-CoA umgewandelt werden (Abbildung 31).¹³⁶

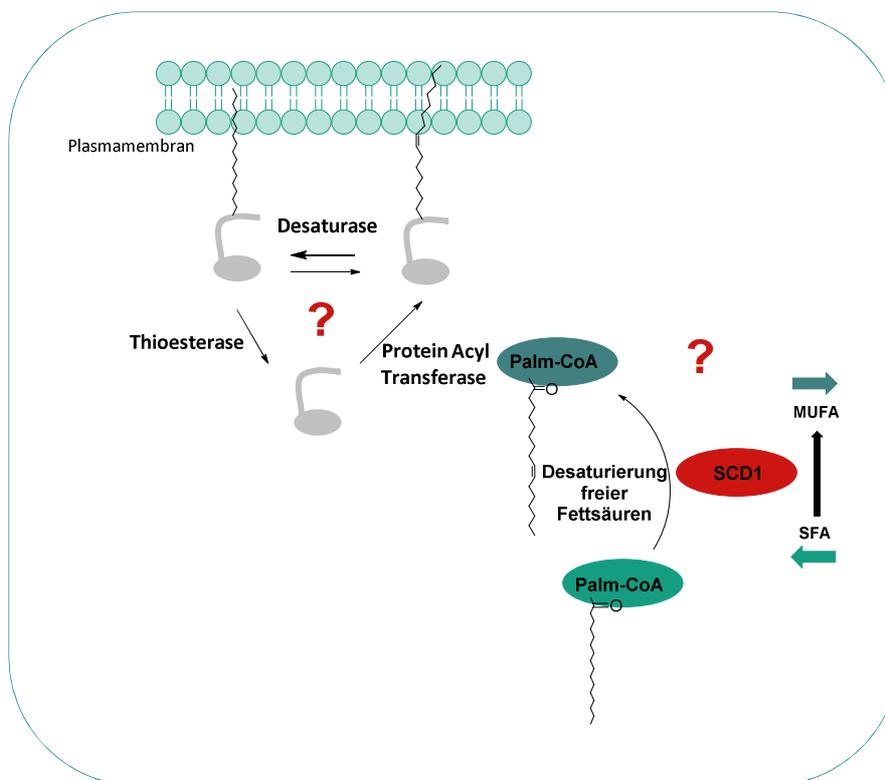


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Hypothesen zur Palmitoleinmodifikation von Proteinen und die Rolle des SCD1.

Um die Wirkung von SCD1 auf die Erzeugung von Proteinen S-acyliert mit Palmitolein- und Oleinsäuren zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Inhibitor (CAY10566) der Stearoyl-CoA-Desaturase SCD1, behandelt (Abbildung 32).

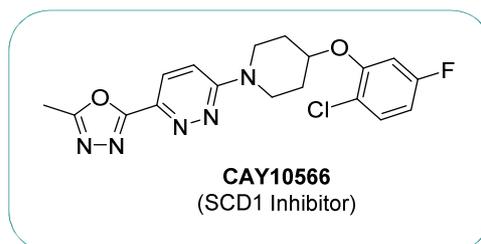


Abbildung 32: Struktur des SCD1-Inhibitors CAY10566.

4.6.1 Untersuchung des gesamten Zelllysates

Um den Einfluss des SCD1-Inhibitors auf die Zelllysate von HEK293- und HeLa-Zellen zu untersuchen wurden die Zellen mit 5 μ M des kommerziell erhältlichen Inhibitors (CAY10566, Abbildung 32) über 48 Stunden inkubiert. Längere Inkubationszeiten (72 h) führten zu Zelltod (Abschnitt 10.6.7).

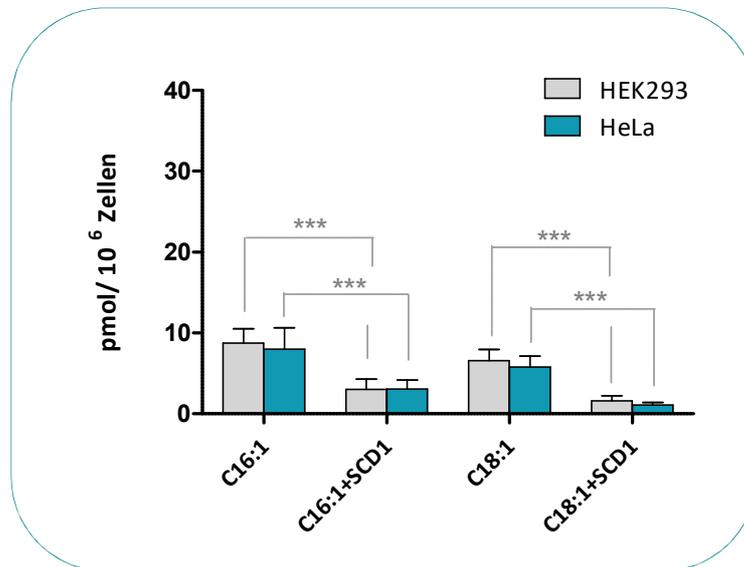


Abbildung 33: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der Zelllinien: HEK293 und HeLa nach der Inkubation mit 5 μ M des SCD1-Inhibitors CAY10566. Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Im direkten Vergleich der Zellen, mit und ohne Inhibition der SCD1-Desaturase, zeigte sich eine signifikante Reduktion der ungesättigten Fettsäuren in den untersuchten Zelllinien HEK293 und HeLa. Dabei konnte eine 3- bzw. 2-fache Reduktion der Palmitinsäure, eine 4- bzw. 5-fache Erniedrigung der Ölsäure und eine 4- bzw. 6-fache Verringerung der Linolsäure in HeK293 bzw. in den HeLa-Zellen gefunden werden (Abbildung 33).

Insgesamt war es nicht möglich die Bildung von Proteinen mit diesen Modifikationen komplett zu verhindern. Aus diesem Grunde schlagen wir die Existenz alternativer Enzyme vor, welche für die Synthese ungesättigter Fettsäuren verantwortlich sein könnten.

4.7 Die Rolle der NCL Proteine in der Zellbiologie

Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL), auch bekannt unter dem Begriff der Batten-Krankheit, gehören zu einer gemeinsamen Gruppe von erblichen neurodegenerativen Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters, die zu einer selektiven Zerstörung und dem Verlust von Neuronen in der zerebralen Hirnrinde und der Retina führen. NCLs kommen dabei mit einer Häufigkeit von 1:30000 Lebendgeborenen vor und gehören zu der Klasse von Krankheiten die autosomal-rezessiv vererbt werden. Das bedeutet, dass die biologischen Eltern als Genträger, jeweils ein gesundes und ein krankes Gen für die NCL besitzen. Trifft der Fall ein, dass beide Teile desselben kranken NCL-Gens auf das Kind übertragen werden, so kann dies in 25 % der Fälle zu einer Erkrankung des Kindes mit einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose kommen. Die unterschiedlichen Formen der NCLs lassen sich je nach Entwicklung des Krankheitsbildes unterscheiden: Die infantile NCL beginnt in den meisten Fällen im ersten Lebensjahr, wohingegen sich die spätinfantile NCL erst ab dem dritten Lebensalter zeigt und die juvenile NCL weit später, ungefähr im Schulalter des Kindes.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Dabei äußern sie klinische Merkmale

wie der progressive Verlust des Sehvermögens sowie mentale und motorische Verschlechterungen, epileptische Anfälle und schließlich kommt es zu einem verfrühten Tod des Erkrankten. NCLs gehören zu einer Klasse von lysosomalen Speicherkrankheiten (LSD), die durch einen heterogenen Ursprung des Speichermaterials gekennzeichnet sind. Dieses Material besteht zumeist aus der Akkumulation von Ceroid-Lipopigmenten, der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase oder dem Sphingolipid Aktivator Proteinen A und D in den Lysosomen.¹³⁷ Die Ursache der Speichermaterial-Akkumulation in NCLs könnte das Ergebnis eines Nebenprozesse sein und muss nicht zwangsläufig zur Klärung der Funktionen von NCL verursachenden Genprodukten führen. Dennoch ist die Aufklärung der Art und der Zellenposition der beteiligten Proteine von entscheidender Bedeutung um die betroffenen Signalwege zu entwirren und gemeinsame Prozesse zu verstehen.

Allgemein unterscheiden sich die NCL-assoziierten Proteine (CLN1 zu CLN14) in ihrer Funktion und ihrer intrazellulären Lokalisation (siehe Tabelle 3). NCL-Proteine lokalisieren meist in Lysosomen (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN7, CLN10, CLN12 und CLN13), aber auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (CLN6 und CLN8) oder sind im Zytosol mit vesikulären Membranen assoziiert (CLN4 und CLN14). Einige von ihnen wie CLN1, die Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 (PPT1), sowie CLN2, die Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1) oder CLN5 mit noch unbekannter Funktion, sind lysosomale lösliche Proteine. Ebenso gehören CLN10, das Cathepsin D und CLN13, das Cathepsin F zu dieser löslichen Protein-Klasse. Andere NCL Proteine, wie CLN3, CLN7 und CLN12 scheinen lysosomale Transmembranproteine zu sein, jedoch wird ihre genaue Lokalisation noch weiter untersucht. Mutationen in NCL Proteinen bewirken die verschiedenen Formen der NCL-Krankheit und die möglichen Wechselwirkungen zwischen Proteinen beeinflussen wiederum unterschiedliche NCL-Signalwege. Trotz der Forschungsbemühungen der letzten Jahre, konnte eine endgültige Aufklärung der Funktion für die Mehrheit der NCL-Proteine noch nicht etabliert werden.¹³⁷⁻¹⁴⁰

Tabelle 3: NCL Proteine und ihre subzelluläre Lokalisation und Funktion.

Gen	Protein	Subzelluläre Lokalisation	Funktion (soweit bekannt)
CLN1	CLN1/ (PPT1), Palmitoyl Protein Thioesterase 1 306 AS, löslich	Lysosomale Matrix, Lipid-Flöße, ER, extralysosomale Vesikel, Präsynapt. Bereiche	Palmitoyl-Thioesterase; Verbindung zur Endo-/ Exozytose bzgl. synapt. Vesikel-Recyclings, Cholesterin-Stoffwechsel, Apoptose
CLN2	CLN2/ TPP1 Tripeptidyl-Peptidase 1 563 AS, löslich	Lysosomale Matrix ER	Serin-Protease; Verbindung zur Makro- autophagie, Endozytose, TNF- α -induzierten Apoptose
CLN3	CLN3 438 AS, transmembran (6 TD)	Spät endosomale/ lysosomale Membran	<u>Postuliert:</u> Endozytose, Autophagie vakuolar/ lysosomal pH, Transport lysosomaler Enzyme, Osmoregulation, Apoptose, Zell-Zyklus, Desaturaseaktivität
CLN4	CLN4/ CSP α Cystein-StrinG-Protein α	Zytosolisch, Verbindung vesik. Membranen, synapt.	Hsc70 Co-Chaperon; präsynapt.

	198 AS, lösliche	Vesikeln, sekret. Granulen (endo/exo/ neurokrine Zellen)	Endo-/Exozytose; Wiederherst. Funktion durch α -Synuclein
CLN5	CLN5 407 AS, löslich	Lysosomale Matrix	<u>Unbekannt</u> ; Transport, Synthese Sphingolipide, Myelinisierung, Zellwachstum, Apoptose, Transport lysosomaler Enzyme, CIMPR
CLN6	CLN6 311 AS, transmembran (7 TD)	ER Membran	<u>Unbekannt</u> ; Autophagie, Endo- zytose, Biometall Stoffwechsels, Regulation des pH
CLN7	CLN7/ MFSD8 518 AS, transmembran (12 TD)	Lysosomale Membran	<u>Postuliert</u> : Transport kleiner Substraten durch/über zelluläre Membranen
CLN8	CLN8 286 AS, transmembran (5 TD)	ER-Membran, ER-Golgi- Zwischenraum-Membran	<u>Postuliert</u> : Transport, Synthese Sphingolipiden, Verbindung zu oxidativem Stress, ER-Stress, Entzündungen, Apoptose, Calcium-Homeostase, mitochond. Funktion
CLN9	CLN9 Unbekannt	Unbekannt	<u>Unbekannt</u>
CLN10	CLN10/ Cathepsin D 412 AS, löslich	Lysosomale Matrix, Extrazelluläre Matrix	Aspartyl-Endopeptidase; Apoptose, Autophagie, Proliferation in Krebszellen, Angiogenese, Invasion und Metastase
CLN11	CLN11/ Progranulin/ Proepithelin / Acrogranin 593 AS, löslich	Extrazellulär	<u>Unbekannt</u> ; Verbindung zur Autophagie, Entzündungen, Embryogenese, Zellbeweglichkeit, Tumorgenese
CLN12	CLN12/ ATPase 13A2/ KRPPD/ PARK9/ HSA9947/ RP-37C10.4) 1180 AS, transmembran (10 TD)	Lysosomale Membran, Multivesikuläre Körper	<u>Postuliert</u> : Tranporter Kationen, Metalle, Lipide durch Zellmembranen, pH/ Biometall, Homeostase, lysosomaler Abbau, Schutz vor α -Synuclein Toxizität
CLN13	CLN13/ Cathepsin F 484 AS, löslich	Lysosomale Matrix	Cystein Protease; Verbindung zum proteasomalen Abbau, Autophagie, Zellimmunität, Abbau Lipoproteine
CLN14	CLN14/ (KCTD7),	Zytosolisch,	<u>Postuliert</u> :

K ⁺ -Kanal-Tetramerisierungsdomäne 7 289 AS, löslich	Verbindung zur Plasmamembran	Hyperpolarisation neuronaler Zellmembranen, Verbindung zum proteasomalen Abbau
--	------------------------------	--

Bis jetzt gehören die NCLs noch zu den unheilbaren Erkrankungen, doch es gibt erste Ansätze für experimentelle Therapien. Die Erforschung der Ursachen der NCLs ist weiterhin eine wichtige Voraussetzung, um Heilmethoden zu finden und im Zuge dessen diese Krankheiten zu therapieren.

4.7.1 Die Funktion von CLN3-Proteinen

Rezessive Mutationen im CLN3-Gen bilden die Ursache der Juvenilen NCL (CLN3)-Krankheit, einer der häufigsten Subtypen der NCLs. Wie bereits erwähnt beginnt die klassische Juvenile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL) im Schulalter des Erkrankten. Erste Anzeichen für einen Ausbruch der Erkrankung sind typischerweise Sehprobleme, welche sich dramatisch verschlimmern, bis die Kinder völlig erblinden. Zusätzlich zeigen sich Konzentrationsschwierigkeiten und die Denkfähigkeit nimmt immer mehr ab. Zudem kommt es zum Auftreten von Krampfanfällen und Bewegungsstörungen. Aber auch psychische Probleme wie Depressionen oder auch Angstzustände einhergehend mit Halluzinationen können entstehen.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Obwohl CLN3-Mutationen zumeist Einfluss auf die motorischen und kognitiven Fähigkeiten haben, gibt es auch Hinweise auf eine Wirkung außerhalb des zentralen Nervensystems, genauer gesagt im Herz- und Immunsystem. CLN3 kodiert ein 438-Aminosäure großes mutmaßlich lysosomales Transmembranprotein mit sechs Transmembrandomänen (TD), wobei sich sowohl N- als auch C-Terminus im Zytosol befinden.¹⁴¹ Die am häufigsten vorkommende krankheitsverursachende Mutation des CLN3-Gens ist eine 1 kb-Deletion, welche die Exons 7 und 8 entfernt und so ein vorzeitiges Stoppcodon erzeugt. Diese Mutation führt zu einer wesentlichen Abnahme der mRNA-Expression und Stabilität, so dass das mutierte und verkürzte Protein wahrscheinlich überhaupt nicht exprimiert wird.¹⁴² Expressionsanalysen zeigen, dass das CLN3-Gen und auch das CLN3-Protein ubiquitär in verschiedenen humanen Geweben und in Geweben von Mäusen exprimiert wird.¹⁴³ Bisher konnten die Gewebeexpressionsmuster sowie die intrazelluläre Lokalisierung von CLN3 noch nicht vollständig aufgeklärt werden, weil in erster Linie das endogene CLN3-Level sehr gering ist und es weiter an spezifischen Antikörpern mangelt. Zudem ist die exakte zelluläre Funktion des CLN3-Proteins immer noch nicht bekannt. In erster Linie wurde CLN3 in Endosomen und Lysosomen gefunden und soll laut einiger Studien an der Endozytose beteiligt sein.¹⁴⁴ In einem Hefe-Ortholog, dem Btn1p, zeigte dieses eine wichtige Rolle beim Transport von einigen Proteinen zwischen den Vakuolen (Hefe Äquivalent des Lysosoms) und dem trans-Golgi Netzwerk.¹⁴⁵ Mit siRNA-Versuchen wurde zudem herausgefunden, dass CLN3 eine Schlüsselrolle beim Ausschleusen von CI-MPR (CD8-CI-MPR) aus dem trans-Golgi-Netzwerk spielt.¹⁴⁶ Weiter wurde CLN3 in mehreren Studien mit dem Prozess der Autophagie verbunden.¹⁴⁷ Dabei scheint die Reifung der Makroautophagie in Patienten die an der Juvenilen CLN3-Krankheit leiden stark verschlechtert zu sein. Andere Studien in Hefe mit Btn1p, sowie nachfolgende Analysen Fibroblasten von Patienten und menschlichen embryonalen Nierenzellen mit CLN3-Mutanten haben Störungen in der Aufrechterhaltung des vakuolären/ lysosomalen pH-Levels gezeigt.¹⁴⁸ Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte ein GFP-fusioniertes CLN3 im Kontraktionssystem der Vakuole einer *Amoeba Dictyostelium* lokalisieren, welches als osmoregulatorisches Organell wirkt und den intrazellulären Wasserhaushalt durch das Sammeln und ausstoßen überschüssigen Wassers aus der Zelle steuert.¹⁴⁹ Weiter scheint CLN3 Aufgaben in den Bereichen der Lysosomen, Zellmigration, Zellproliferation, Apoptose, der Zellmorphologie und der Myosin Verteilung einzunehmen.¹⁵⁰⁻¹⁵² In einer Studie von

Rusyn *et al.* wurde gezeigt, dass das Wild Typ CLN3, aber nicht die mutierte CLN3-Variante, an Galactosylceramid bindet. Der Wild Typ scheint somit als Galactosylceramid-Transporter zu fungieren.¹⁵³ In der gleichen Studie wurde angedeutet, dass die Hemmung der Galactosylceramid-Synthese in normalen Zellen das Zellwachstum negativ beeinflusst und die Apoptose induziert, was darauf hindeutet, dass Galactosylceramid das Verbindungsstück zwischen den berichteten Veränderungen im Zellwachstum oder der Apoptose in CLN3-erkrankten Zellen darstellt.¹⁵³ Zhu *et al.* konnte ebenfalls zeigen, dass eine Runterregulation des CLN3-Proteins, in HCT116 Darmkrebs Zellen, die Proliferation hemmt, die Apoptose fördert und einen G₀/ G₁ Zellzyklusarrest induziert.¹⁵⁴ Wu *et al.* konnte zeigen, dass eine CLN3 Überexpression die Proliferation erhöht und eine Resistenz gegen eine Tunicamycin induzierten Apoptose in neuroblastoma SH-SY5Y-Zellen induziert.¹⁵⁵

Wie sich zeigt, scheint CLN3 insgesamt auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen zu wirken, einschließlich lysosomaler pH-Regulierung, Autophagie, Endozytose, Proteintransport vom trans-Golgi, Proliferation und Apoptose. Es ist jedoch unklar, in welchem dieser Prozesse das CLN3 eine echte funktionelle Rolle spielt und in welchen Verfahren es nur als sekundäre Folge seiner primären Funktion auftritt. Sequenzanalysen des CLN3-Proteins mit Hilfe des Pfam-Servers, lassen zudem eine Fettsäure-Desaturase-Domäne vermuten.¹⁵⁶ Diese Vermutung wurde 2006 in einer Studie weiter untersucht. Ihre Daten zeigten, dass das CLN3 ein Enzym mit einer bisher nicht bekannten Δ^9 -Desaturase-Funktion zu sein scheint.¹⁵⁷ In der Studie wurde die Desaturaseaktivität verschiedener Substrate getestet; einschließlich Myristoyl-, Stearoyl- und Palmitoyl-Coenzym A ebenso gegenüber den freien Säuren, wie Palmitin-, Myristin-, Stearin-, Öl- und Linolsäuren sowie einem palmitoylierten *H*-Ras Protein. Dabei zeigte sich eine Desaturaseaktivität für die gesättigten freien Fettsäuren mit einer detektierten Kettenlänge von C14 (Myristinsäure) und C16 (Palmitinsäure) und einer maximalen Aktivität für die Palmitinsäure. Es konnte keine Aktivität gegenüber Stearinsäure und der einfach ungesättigten bzw. zweifach ungesättigten C-18-Fettsäuren detektiert werden.¹⁵⁷ Durch diese Substrataffinität unterscheidet sich das CLN3-Protein klar von zuvor beschriebenen und charakterisierten Desaturase-Enzymen, die hauptsächlich Fettsäure-Coenzym als Substrate annehmen.

Die Möglichkeit, dass Proteine auch posttranslational mit ungesättigten Fettsäuren lipidiert werden könnten, wurde, bis wir dieses Projekt gestartet haben, nicht als Option betrachtet und bleibt ein kritischer Bereich der Forschung auf diesem Gebiet. Die Option, dass CLN3 die Funktion einer S-verknüpften Palmitoyl-Protein Δ^9 -Desaturase besitzen könnte und somit Doppelbindungen in S-palmitoylierte Cysteine in Proteinen einbringen könnte, sollte durch weitere Studien untersucht werden.

Im ersten Schritt wurde dazu ein palmitoyliertes Protein (*N*-Ras) als Kandidat und Substrat für die Desaturaseaktivitäts-Studien des CLN3-Proteins ausgewählt, da aus vorherigen Studien¹⁵⁷ prognostiziert wurde, dass palmitoylierte Proteine, neben ihrer Substrateigenschaft für Thioesterasen, wahrscheinlich auch physiologische Substrate für CLN3-Proteine darstellen.

Um einen tieferen Einblick in dieses Thema zu erhalten, wurden Fluoreszenz-markierte Proteine in neuronalen Maus-Zellen (N2a-Zellen) stabil transfiziert. Zum einen sollte durch ein mCherry-markiertes CLN3-Konstrukt dessen Lokalisierung geklärt werden, weiter sollte der Einfluss einer CLN3 Überexpression auf palmitoylierte Proteine untersucht werden. Dazu wurde ein eGFP-markiertes *N*-Ras-Protein zusammen mit einem mCherry-markierten CLN3 in die N2a-Zellen stabil co-transfiziert und die freigesetzten Fettsäurehydroxamate wurden der MS-Analyse unterzogen.

4.8 Stabile Transfektion von mCherry-CLN3 und eGFP-NRas

Um die gewünschten Proteine, mCherry-CLN3 bzw. eGFP-N-Ras und mCherry-CLN3, in die neuronale Zelllinie (N2a) stabil zu transfizieren, wurde erneut das Amaxa Nucleofektions®-System verwendet (Abschnitt 4.4.1). Die Transfektionseffizienz wurde durch Messung der Genexpression durch Echtzeit-quantitative PCR (qPCR) bestimmt und eine Westernblot-Analyse wurde verwendet um die relative Expression des transfizierten Proteins unter Verwendung von Anti-Tubulin als interne Kontrolle zu bestimmen (Abbildung 34A,B).

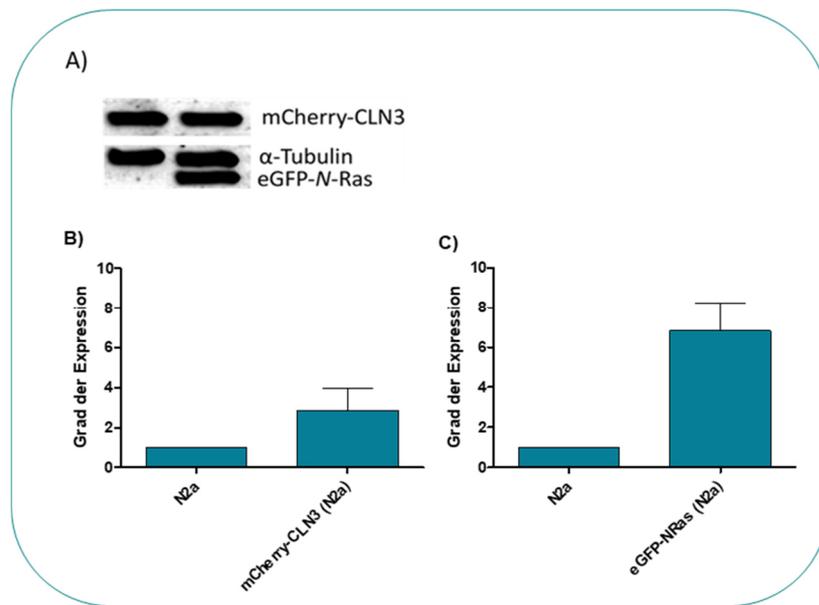


Abbildung 34: A) Westernblot der Überexpression. Links: Anti-mCherry- und α -Tubulin Antikörper. Rechts: Cotransfizierte Zellen, Anti-mCherry-/ α -Tubulin- und Anti-eGFP-Antikörper. B) Auswertung der qPCR. Ergebnisse des Grads der Überexpression für mCherry-CLN3 in N2a-Zellen. C) Auswertung der qPCR. Ergebnisse des Grads der Überexpression für eGFP-N-Ras in N2a-Zellen.

Dabei lag der Grad der Überexpression für die stabile Transfektion von eGFP-N-Ras in N2a-Zellen bei einem 7-fachen Überschuss und die von mCherry-CLN3 bei einem knapp 2-fachen Überschuss im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen.

Darüber hinaus konnte eine direkte Identifizierung von N2a-transfizierten Zellen bei der mikroskopischen Visualisierung der Konstrukte erreicht werden (Abbildung 35, Abbildung 36; Abschnitt 10.5.4).

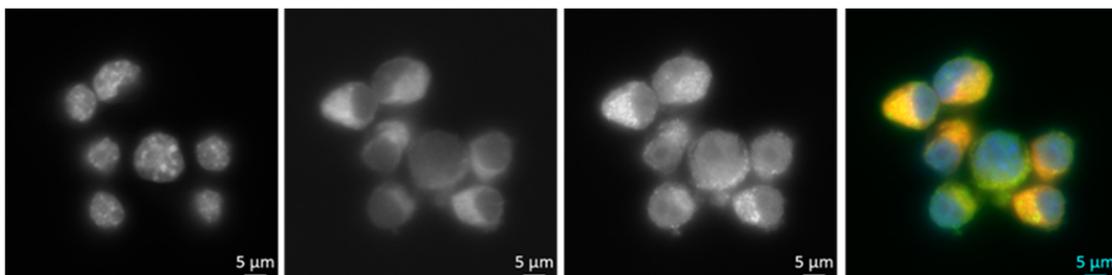


Abbildung 35: Stabile Transfektion von mCherry-CLN3 in N2a-Zellen. Links nach rechts: DAPI gefärbter Nukleus (Blau); Signal von mCherry-CLN3 (Rot); Anti-Rab7 Färbung (Grün); Überlagerung der Kanäle. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop. Das Objektiv war ein 63x Öl-Immersion-Objektiv.

Auf den Bildern lässt sich klar die Färbung des Nukleus durch das Reagenz DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) erkennen. Um die Lokalisierung des mCherry-CLN3-Proteins im Lysosom zu überprüfen,

wurde zusätzlich das lysosomale Protein Rab7 angefärbt. Die Überlagerung der drei Aufnahmen zeigt, dass wir eine klare Überlagerung der zwei im Lysosom befindlichen Proteine CLN3 (rot) und Rab7 (grün) erkennen können (Abbildung 35). Zusätzlich konnte durch diese Aufnahmen die Expression des fluoreszenten mCherry-CLN3-Proteins auch visuell bestätigt werden.

Die stabile Co-Transfektion der Konstrukte eGFP-*N-Ras* und mCherry-CLN3 in die N2a-Zellen konnte ebenfalls mikroskopisch überprüft werden (Abbildung 36).

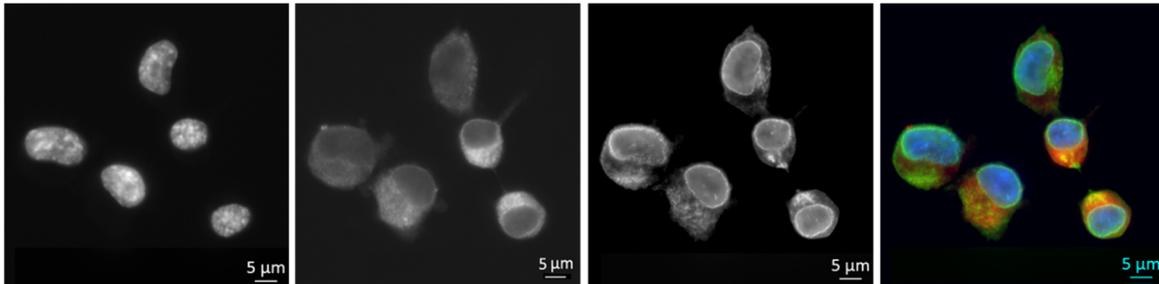


Abbildung 36: Stabile Co-Transfektion von mCherry-CLN3 und eGFP-*N-Ras* in N2a-Zellen. Links nach rechts: DAPI gefärbter Nucleus (Blau); Signal von mCherry-CLN3 (Rot); Signal von eGFP-*N-Ras* (WGA-488, Grün); Überlagerung der Kanäle. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop. Das Objektiv war ein 63x Öl-Immersion-Objektiv.

Auf den Aufnahmen lässt sich klar die Färbung des Nucleus durch das Reagenz DAPI erkennen (links). Direkt daneben befindet sich das Signal des lysosomalen mCherry-CLN3-Proteins, gefolgt vom Signal des Co-transfizierten eGFP-*N-Ras*. Die Überlagerung der drei Aufnahmen zeigt, dass wir an einigen Stellen eine mögliche Überlagerung sehen, was für eine räumliche Nähe der zwei Proteine sprechen könnte (Abbildung 36). Allerdings sind weitere Studien nötig, um diese Indizien weiter zu überprüfen.

Nach den erfolgreichen stabilen Transfektionen sollte mit Hilfe des Lipidextraktions-Protokolls der Einfluss des CLN3-Proteins untersucht werden.

4.8.1 Immunopräzipitation und Analyse

Um die Lipidzusammensetzung der stabil transfizierten N2a-Zelllinien zu überprüfen, wurden die immunopräzipitierten Proteine (mCherry-CLN3 bzw. eGFP-*N-Ras* und mCherry-CLN3) sowohl mit und ohne vorherige Inkubation mit dem APT-Inhibitor ML348 untersucht (Abschnitt 10.6.6).

Dazu wurde ein eGFP-markiertes *N-Ras*-Protein zusammen mit einem mCherry-markierten CLN3 in die N2a-Zellen stabil co-transfiziert, und die freigesetzten Fettsäurehydroxamate wurden der MS-Analyse unterzogen. Überexprimiertes *N-Ras*-Protein bzw. mCherry-CLN3-Protein wurde durch Antikörper-Immunopräzipitation unter Verwendung von Anti-eGFP- bzw. Anti-mCherry-modifizierter Agarose isoliert. Dazu wurde das jeweilige Lysat zuerst mit dem spezifischen Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert und im Anschluss über Protein A/G Plus Agarose-Kügelchen gebunden (Abschnitt 10.6.5). Die an Agarose gebundenen Proteinfractionen wurden mit dem FITC-Linker inkubiert und die freigesetzten Fettsäurehydroxamate wurden, wie zuvor beschrieben, mittels HR-MS analysiert.

Nach der massenspektrometrischen Untersuchung zeigte sich, dass CLN3 selbst mit Palmitin- und Palmitoleinsäure acyliert zu sein scheint. Die co-transfizierten Zellen scheinen nur Proteine zu enthalten, die mit Palmitoleinsäure modifiziert wurden. Diese Indizien deuten sehr stark auf die vorgeschlagenen Desaturaseaktivität des CLN3-Proteins hin. Durch die Inhibition mit dem APT1 Inhibitor (ML348) ließ sich erneut eine leichte Steigerung der Gesamtmenge an Fettsäuren erkennen.

Interessanterweise zeigte das Lipidmuster der co-transfizierten N2a-Zellen keine Palmitinsäure, sondern nur die ungesättigte Palmitoleinsäure (Abbildung 37).

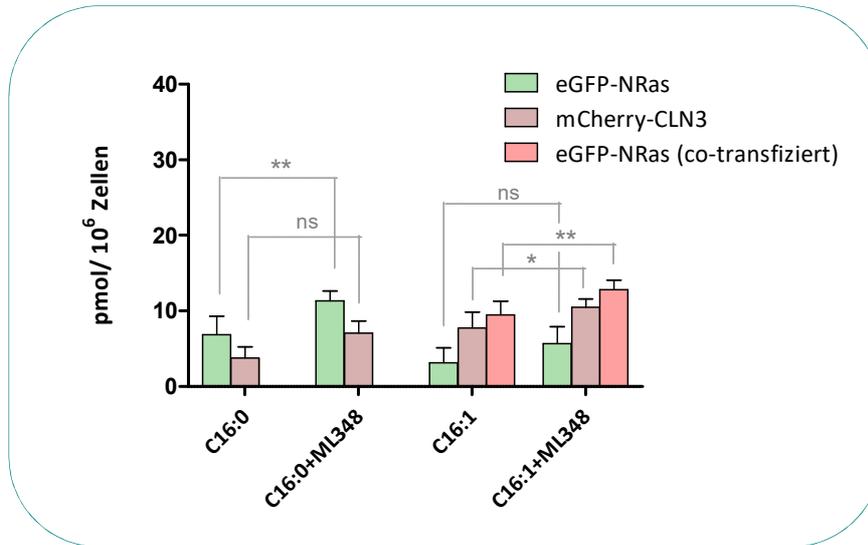


Abbildung 37: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion der Immunopräzipitation der mCherry-CLN3 und eGFP-N-Ras Spezies: eGFP-N-Ras und co-transfiziertes eGFP-N-Ras (eGFP-N-Ras und mCherry-CLN3 in N2a Zellen) und nach der Inkubation mit jeweils 30 μ M des APT-Inhibitors ML 348 im Vergleich zum Fettsäuregehalt ohne Inhibitor. Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Dieser wichtige Hinweis könnte dabei helfen, die Aktivität von CLN3 als Protein-Desaturase weiter zu stärken und es somit zum ersten Protein mit eben dieser Funktion zu identifizieren.

In der Literatur wurden bereits Versuche unternommen, das CLN3-Interaktom genauer zu analysieren.¹⁵⁸ Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 4) zeigt eine Zusammenstellung der in der Literatur gefundenen Proteine, die mit CLN3 voraussichtlich in Interaktion treten. Dabei zeigte sich, dass eine Vielzahl dieser Interaktionspartner (21) palmitoyliert ist. Zusätzlich zu den in der Literatur gefundenen bzw. bewiesenen Palmitoylierungsstellen, nutzen wir zwei Kalkulationsprogramme (SwissPalm und CSS-Palm), um weitere Palmitoylierungsseiten innerhalb der Interaktionspartner zu identifizieren. Dabei zeigte sich eine Gesamtheit von 32 Proteinen, die potenziell palmitoyliert werden können.

Tabelle 4: Auflistung verschiedenster palmitoylierter Proteine die mit dem CLN3-Interaktom in Verbindung stehen.

*: Berechnung durch CSS-Palm. **: Berechnung durch Swiss-Palm und CSS-Palm. [Ref.]: Bestätigung der Palmitoylstelle durch Literaturstellen.

Protein	Name ^[Ref.]
ADGRL2	Adhesion G-Protein-coupled receptor L2*
ARF3	ADP-ribosylation factor 3 ^[61, 139, 140]
ARF4	ADP-ribosylation factor 4 ^[141, 142]
ARF5	ADP-ribosylation factor 5 ^[141-143]
ARMC6	Armadillo repeat-containing-Protein 6*
ATP1A1	Sodium/ potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 ^{[139, 143, 144]**}
ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2**
ATP5L	ATP synthase subunit g, mitochondrial
AUP1	Ancient ubiquitous protein 1 ^{[139]**}

CALU	Calumenin ^{[139]**}
CDS2	Phosphatidate cytidyltransferase 2*
COX15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog**
CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase 1 ^[139]
CSE1L	Exportin-2 ^{[139]*}
DBH	Dopamine beta-hydroxylase
DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit**
DPM1	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1
ECM29	Proteasome-associated protein ECM29 homolog**
EMD	Emerin
Erlin-2	ERLIN2*
FADS2	Fatty acid desaturase 2
FAR1	Fatty acyl-CoA reductase 1
FKBP8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8**
GCN1	General control of amino-acid synthesis 1-like protein 1*
HACD3	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3**
HSD17B12	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase ^{[139, 141]*}
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein ^{[139]**}
LPGAT1	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1*
MIC13	MICOS complex subunit MIC13
NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205**
PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase**
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit ^{[139]**}
RCN2	Reticulocalbin-2*
RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 ^[141, 142]
RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2
SAMM50	Sorting and assembly machinery component 50 homolog
SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3 ^{[139, 142, 143, 145]**}
SEC61A1	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1**
SFXN1	Sideroflexin-1**
SFXN3	Sideroflexin-3**
SLC25A1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial
SLC25A10	Mitochondrial dicarboxylate carrier**
SLC25A11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein ^[139]
SLC25A13	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2
SLC25A22	Mitochondrial glutamate carrier 1
SLC25A3	Phosphate carrier protein, mitochondrial ^{[139, 142]*}
SLC25A4	ADP, ATP carrier protein 1 ^[141]
SLC25A5	ADP/ATP translocase 2 ^[141]
SLC25A6	ADP/ATP translocase 3 ^[139, 141]
SLC35B2	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 ^{[139, 145]**}
ssr4	SWI/SNF and RSC complexes subunit ssr4

STRA6	Stimulated by retinoic acid gene 6 protein homolog*
TECR	Very-long-chain enoyl-CoA reductase
TFRC	Transferrin receptor protein 1 ^{[139, 143]**}
TMEM33	Transmembrane protein 33
UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
XPO1	Exportin-1 ^{[139, 142]**}
XPO5	Exportin-5*

Eine Vielzahl der mit CLN3 interagierenden Proteine weisen Palmitoylierungen auf oder sind in Stoffwechselwegen, in denen Fettsäuren eine wichtige Rolle spielen, involviert, wie beispielsweise FADS2, FAR1, HACD3 und weitere.

Die Ergebnisse der Extraktion und der Literaturrecherche sollten durch weitere Experimente im Detail erforscht werden. Zuerst sollte die Palmitoylierungsstelle des CLN3-Proteins mittels enzymatischen Verdau bewiesen werden. Außerdem sollten die Desaturaseaktivität der CLN3 transfizierten Zellen bestimmt werden. Dazu sollten diese Zellen vor der Extraktion mit einer ¹³C-markierten Palmitinsäure inkubiert werden und anschließend der Umbau in die zugehörige ¹³C-markierte Palmitoleinsäure untersucht werden.

4.9 Überprüfung der Palmitoylstelle im CLN3-Protein

Um die Palmitoylstelle des CLN3-Proteins (Computerprogramm CSS-Palm 4.0. und Swisspalm: Cystein-612 (Rot) und Cystein-613 (Orange)) zu überprüfen, wurden zwei Methoden parallel getestet. Zum einen wurden die mit mCherry-CLN3 stabil transfizierten N2a-Zellen (Abschnitt 10.5.3 und 10.5.5) kultiviert, lysiert und für eine möglichst reine Isolierung des mCherry-CLN3-Proteins mittels Immunopräzipitation auf kleine Agarose-Kügelchen gebunden und nach mehreren Waschschritten einem enzymatischen Verdau unterzogen (siehe Abschnitt 10.4.17). Parallel wurde das humane mCherry-CLN3-Protein in *Trichoplusia ni* Zellen¹⁵⁹⁻¹⁶¹ von unserem Kooperationspartner Dennis Quentin exprimiert, isoliert und stabil aufgereinigt. *Trichoplusia ni* Zellen, sind robuste und wenig stressempfindliche Zellen, die in der Zellkultur adhärent und in Suspension wachsen. Sie werden für die Produktion rekombinanter Proteine durch Insektenzellkultur genutzt und können besonders gut mit Baculoviren infiziert werden. Dabei macht man sich zu nutze, dass das Genom des Virus relativ leicht modifiziert werden kann, um große Mengen des rekombinanten Proteins zu synthetisieren.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Anschließend wurde es ebenfalls einem enzymatischen Verdau unterzogen. Leider konnte weder die Wahl des Enzyms (Trypsin und Chymotrypsin) noch durch die Art der Isolierung und Probenvorbereitung eine 100%-ige Sequenzabdeckung erreicht werden. Die mCherry-CLN3-Proteinsequenz konnte lediglich bis zu 55% identifiziert werden (Abbildung 38, grün). Die für die Palmitoylierung relevanten Bereiche der Proteinsequenz (Cys-612 und Cys-613) liegen jedoch nicht im Bereich dieser Sequenzabdeckung.



Abbildung 38: Darstellung der mCherry-CLN3-Protein Sequenz (Q13286-mCherry-CLN3 human Battenin) und berechnete Palmitoylierungsstellen durch das Computerprogramm CSS-Palm 4.0. und Swisspalm: Cystein-612 (Rot) und Cystein-613 (Orange). Grün: Sequenzabdeckung nach chymotryptischem Verdau.

4.10 Einbau von ^{13}C -markierter Palmitoleinsäure

Als nächstes sollte die Wirkung der CLN3-Überexpression auf den Gehalt an S-acylierten Fettsäuren untersucht werden. Mit diesem Ziel wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zuerst wurde der Gehalt an S-acylierten Fettsäuren in Zellen, die mCherry-CLN3 überexprimieren, bestimmt und dieser im Anschluss mit dem Gehalt nicht-transfizierter N2a-Zellen verglichen.

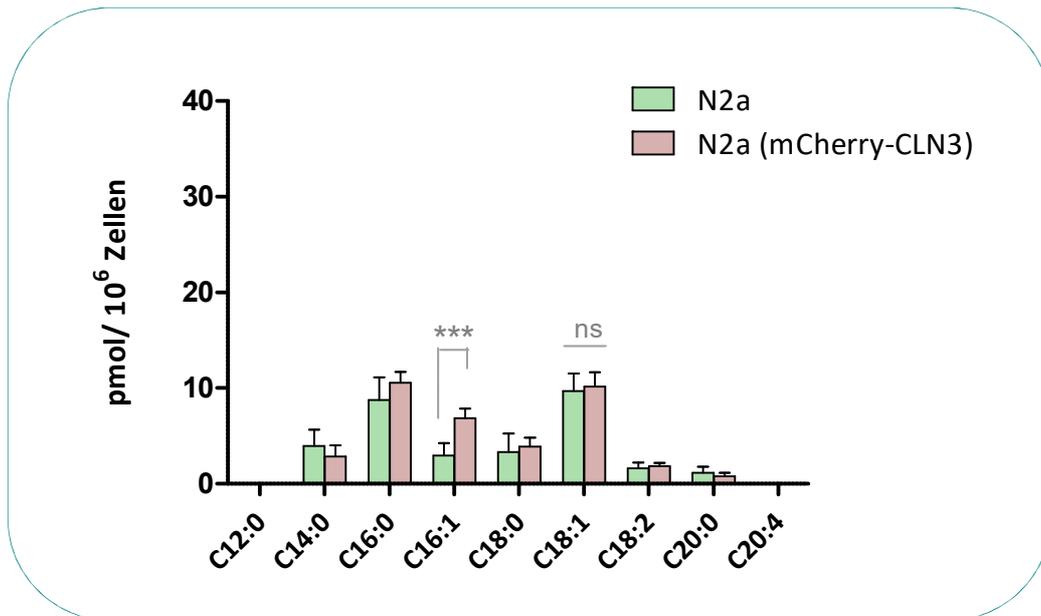


Abbildung 39: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der Zelllinien: N2a und der stabilen Transfektion von mCherry-CLN3 in N2a (N2a (mCherry-CLN3)). Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Im direkten Vergleich der beiden Zelllinien zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ungesättigten Palmitoleinsäure in den CLN3 überexprimierenden Zellen. Kein signifikanter Effekt konnte für die anderen ungesättigten Fettsäuren beobachtet werden. Dieser Befund steht im Einklang mit einer Studie aus dem Jahr 2006, in dem die Desaturaseaktivität von CLN3 gegenüber verschiedener Substrate, einschließlich Myristoyl-, Stearoyl- und Palmitoyl-Coenzym A, getestet wurde. Dabei zeigte sich eine Desaturaseaktivität für die gesättigten freien Fettsäuren mit einer detektierten Kettenlänge von C14 (Myristinsäure) und C16 (Palmitinsäure) und einer maximalen Aktivität für die Palmitinsäure. Wohingegen keine Aktivität gegenüber Stearinsäure und der einfach ungesättigten bzw. zweifach ungesättigten C-18-Fettsäure detektiert werden konnte.^[156]

Als nächstes wurde die Fähigkeit von CLN3 überexprimierenden Zellen zur Umwandlung einer ¹³C-markierten Palmitinsäure in die gesättigte ¹³C-markierte Palmitoleinsäure untersucht. Dabei wurden erneut zwei unterschiedliche Zelltypen miteinander verglichen, die untransfizierten N2a-Zellen und die mCherry-CLN3 überexprimierenden N2a-Zellen. Um die nicht-natürliche Fettsäure zu inkorporieren, wurden die Zellen 48 Stunden mit 400 μ M dieser Fettsäure inkubiert. Nach der Extraktion wurden die Proben mit dem Linker über Nacht inkubiert und mit dem Internen Standard versehen, getrocknet und im Anschluss in Methanol aufgenommen. Um eine weitere Kontrollen zu haben, wurde erneut ein Teil jeder Probe ohne Linker inkubiert und analysiert (Abschnitt 10.6.4).

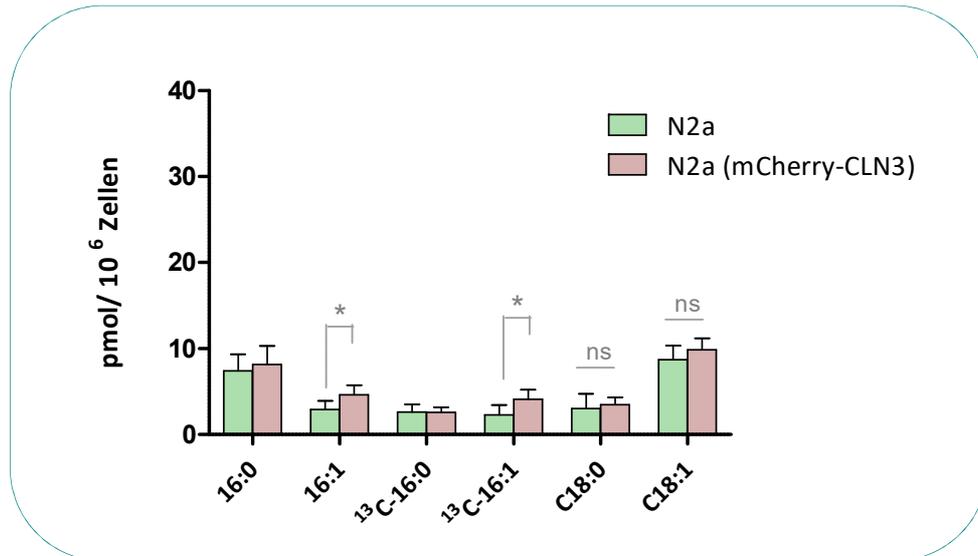


Abbildung 40: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion des gesamten Zelllysates der Zelllinien: N2a und der stabilen Transfektion von mCherry-CLN3 in N2a (N2a (mCherry-CLN3)) nach Zugabe von ¹³C-markierter Palmitoleinsäure. Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mengen der nicht-natürlichen detektierten Fettsäure (¹³C-markierte Palmitoleinsäure) in allen Fällen in einer ähnlichen Signalintensität vorkommt (Abbildung 40). Die markierte Palmitinsäure konnte somit leicht in die S-acylierten Proteine eingebaut und auch in Palmitoleinsäure umgewandelt werden. Darüber hinaus zeigen die Zellen, die CLN3 überexprimieren, eine signifikante Zunahme bei der Umwandlung der gesättigten C-16:0 Fettsäure in die ungesättigte C16:1, was ferner die potentielle Rolle von CLN3 als Fettsäure-Desaturase nahelegt.

Um diese These weiter zu untersuchen, wurden in einer weiteren Studie der Einbau und Umsatz der ¹³C-markierten Palmitinsäure in immunpräzipitierten Zellen untersucht. Dazu wurde eGFP-N-Ras aus zwei verschiedenen Zelltypen isoliert, N2a-Zellen, die eGFP-N-Ras (grün) überexprimieren und N2a-Zellen, die sowohl mit eGFP-N-Ras als auch mit mCherryCLN3 co-transfiziert wurden. Nach Abschluss des Lipides-Extraktions-Protokolls wurden die gefundenen Fettsäurehydroxamate massenspektrometrisch analysiert.

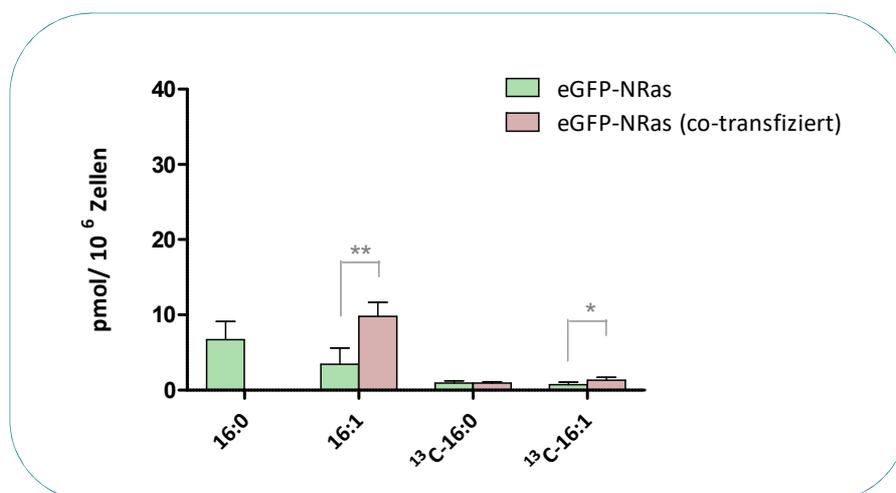


Abbildung 41: Quantifizierung des Fettsäuregehaltes nach der Lipidextraktion der Immunpräzipitation der mCherry-CLN3 und eGFP-N-Ras Spezies: eGFP-N-Ras und co-transfiziertes eGFP-N-Ras (eGFP-N-Ras und mCherry-CLN3 in N2a Zellen) nach Zugabe von ¹³C-markierter Palmitoleinsäure. Mittelwert \pm SD (n = 5). ns= nicht signifikant, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0005, Student's t Test.

Es konnten ähnliche Ergebnisse wie in der Untersuchung des gesamten Zelllysates gefunden werden. Die markierte Palmitinsäure konnte leicht in die S-acylierten Proteine eingebaut und auch in Palmitoleinsäure umgewandelt werden. Darüber hinaus zeigen die Zellen, die CLN3 überexprimieren, eine signifikante Zunahme bei der Umwandlung der gesättigten C-16:0 Fettsäure in die ungesättigte C16:1, was erneut die potentielle Rolle von CLN3 als Fettsäure-Desaturase nahelegt (Abbildung 41).

Die Ergebnisse der bisherigen Studien unterstreichen das Potential von CLN3, palmitoylierte Substrate in ihre ungesättigten Varianten umzuwandeln. Um die Ergebnisse zu verifizieren, sollten in naher Zukunft das aufgereinigte CLN3-Protein, sowie Patientenzellen, genauer Lymphoblastenzelllinien von erkrankten Patienten, in einem weiteren Assays untersucht werden. Aus diesem Grunde arbeiten unsere Kooperationspartner an der Expression und Isolation des humanen CLN3-Proteins, welches dann in weiteren Studien genutzt werden könnte, um die bisherige Hypothese in einem Protein- Assay zu beweisen.

4.11 Partitionierungsstudien ligierter *N*-Ras-Proteine

Um die Unterschiede zwischen der Lokalisierung von Palmitin- bzw. Palmitoleinsäure modifizierten Proteinen zu untersuchen, sollten zwei lipidierte *N*-Ras-Proteine, modifiziert mit Palmitin- bzw. Palmitolein-Analoga, synthetisiert werden. Dazu wurden nicht hydrolysierbare Hexadecylderivate anstelle der natürlichen Palmitoyl- bzw.- Palmitoleinreste in das C-terminale *N*-Ras-Heptapeptid eingeführt, um im Anschluss an die Ligation den Einfluss der unterschiedlichen Lipidreste auf die Membranlokalisierung mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) zu untersuchen. Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte in einer Kooperation mit der Winter-Gruppe der Technischen Universität Dortmund.

Für die Herstellung der semisynthetischen Proteine mussten zu allererst die dementsprechenden lipidierten Bausteine synthetisiert werden.

4.11.1 Synthese der Fmoc-geschützten Bausteine

Der farnesylierte, Fmoc-geschützte Cystein-Baustein (30) wurde nach der bereits etablierten Synthese durchgeführt.¹⁶² Dazu wurde *trans, trans*-Farnesylchlorid in Gegenwart einer 7 N Ammoniak-haltigen Lösung mit Cystein-Hydrochlorid umgesetzt. Anschließend erfolgte die Fmoc-Urethan Schützung des primären Amins (Abbildung 42), und der Baustein (30) konnte in einer Ausbeute von 88 % erhalten werden.

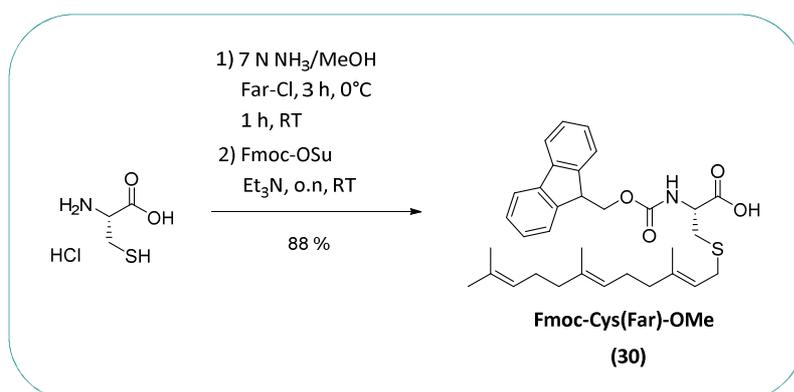


Abbildung 42: Synthese des farnesylierten Fmoc-Cysteins.

Das Hexadecan- bzw. Hexadec-9-ene (33 bzw. 37) modifizierte Fmoc-Cystein konnte ebenfalls in Analogie an eine bereits etablierte Methode synthetisiert werden.¹⁶² Dazu wurde jeweils ein *S*-Trityl geschütztes Fmoc-Cystein unter sauren Bedingungen entschützt und im Anschluss in einer radikalischen Alkylierung mit AIBN (2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)) und dem jeweiligen Alken (32 bzw. 36) modifiziert (Abbildung 43).

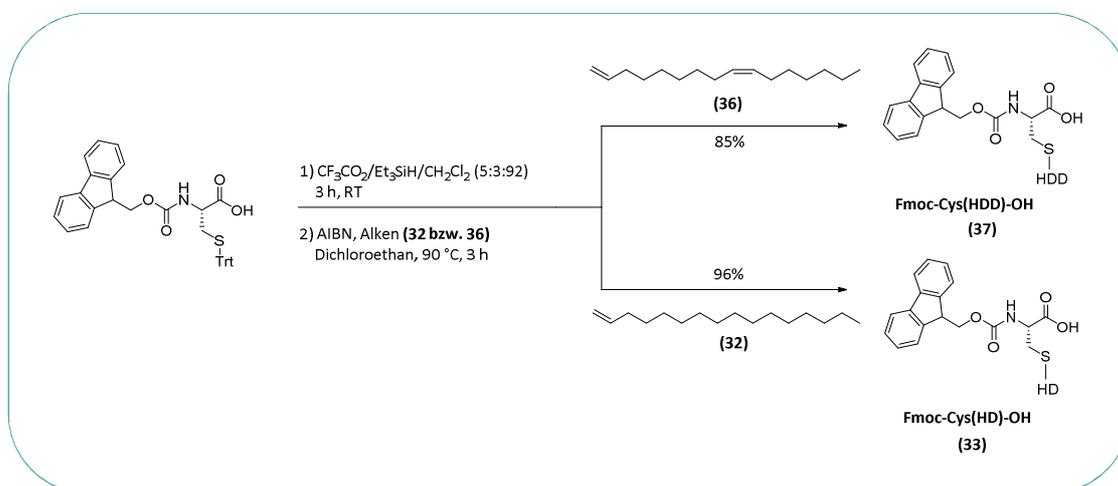


Abbildung 43: Synthese der HD- bzw. HDD modifizierten Fmoc-Cystein-Bausteine.

Der Hexadecan- bzw. Hexadec-9-ene modifizierte Fmoc-Baustein (33 bzw. 37) konnte dabei mit einer Ausbeute von 85% bzw. 96% im finalen Schritt erhalten werden.

4.11.2 Synthese der Peptidsequenzen

Die Synthese doppelt lipidierter Proteine stellt eine besondere Herausforderung dar, sofern diese Peptide neben dem säurelabilen Farnesylrest auch noch einen instabilen Thioester tragen. Da dieser neben seiner Empfindlichkeit gegenüber Nucleophilen auch ein Potenzial für Nebenreaktionen besitzt, wie beispielsweise eine schnelle *S*, *N*-Verschiebung, die eintritt, sobald das Amin des Cysteins in einer ungeschützten Form vorliegt. Daher wurden stabilere Varianten dieser Lipidierung (Abbildung 43) synthetisiert werden, um eine stabile Verankerung einer C-16 langen Kette am Cystein zu gewährleisten und diesen so für die späteren Studien nutzen zu können. Für die Synthese dieser lipidierten Peptide wurde das säurelabile 2-Chlorotriethylchlorid-Harz mit den entsprechenden Bausteinen beladen.

Das 2-Chlorotriethylchlorid-Harz wurde im ersten Schritt mit dem farnesylierten Baustein (30) (Abbildung 42) beladen. Im Anschluss daran wurde die Verlängerung der Peptidkette mittels manueller Kupplungen aufgebaut. Außer der Aminosäure Prolin, welche in einer Doppelkupplung angebracht wurde, wurden die weiteren Bausteine in Einfachkupplungen mit HCTU als Aktivator und DIPEA als Base eingeführt.

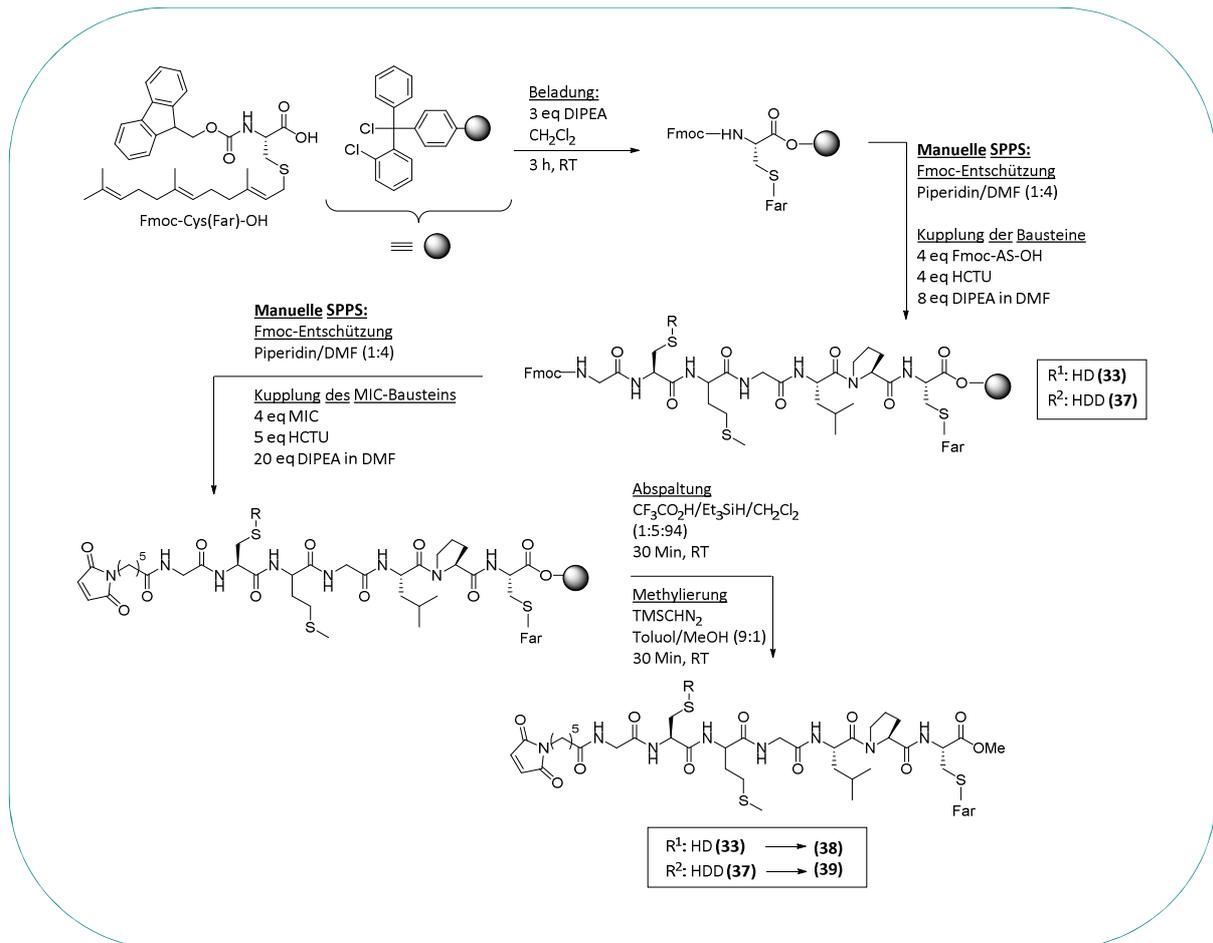


Abbildung 44: Synthese der HD- bzw. HDD modifizierten Peptidsequenzen.

Da lipidierte Cysteine dafür bekannt sind, sterisch anspruchsvoller zu sein, wurde für das auf das HD bzw. HDD modifizierte Cystein folgende Glycin eine Dreifachkupplung vorgenommen, um Abbruchsequenzen zu vermeiden.

Die Maleimidocaprinsäure wurde ebenfalls doppelt gekuppelt, bevor die Peptidsequenz unter leicht-sauren Bedingungen abgespalten werden konnte.

Tabelle 5: Überblick der modifizierten Peptidsequenzen und ihre Ausbeuten.

Modifizierte Sequenz	Ausbeute
MIC-Gly-Cys(HD)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (38)	25%
MIC-Gly-Cys(HDD)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (39)	21%

Nach der Aufreinigung der freien Säure wurde der C-terminale Ester in einem finalen Schritt durch Trimethylsilyldiazomethan methyliert und säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeute des HD modifizierten Peptides (**38**) betrug 25% und die des HDD modifizierten Analogons (**39**) betrug 21% (Abbildung 44).

4.11.3 MIC-Ligation der lipidierten Peptidsequenzen

Um die synthetisierten Peptide mit dem gewünschten Protein zu ligieren, wurde die jeweilige lipidierte Peptidsequenz mit Hilfe ihrer N-terminalen Maleimidfunktion an ein bakteriell exprimiertes N-Ras-Protein angeknüpft.^{163,164} Das (Δ 1-181) verkürzte N-Ras-Protein (Δ 1-181) wurde von C. Nowak in *E. coli* rekombinant exprimiert. Es ist bereits bekannt, dass das Entfernen der letzten acht Aminosäuren

weder die Expression in *E. coli* noch die Bindung des Nukleotids bzw. die Wechselwirkung mit Effektoren wie der Ras-bindenden Domäne (RBD) beeinflusst.¹⁶⁴ Da die zwei lipidierten Sequenzen sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation als auch hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht werden sollten, wurden diese Sequenzen an das verkürzte *N*-Ras-Protein ($\Delta 1-181$) Wild Typ Protein, als auch an eine zuvor BODIPY markierte Variante des *N*-Ras-Proteins ($\Delta 1-181$) ligiert (Abbildung 45). Die Markierung erfolgte vor der Ligation mit kommerziell erhältlichem BODIPY-NHS Ester, welcher unspezifisch an die freien Amine des Proteins bindet. Die Effizienz der Markierung betrug nach der Gelfiltration 45%.

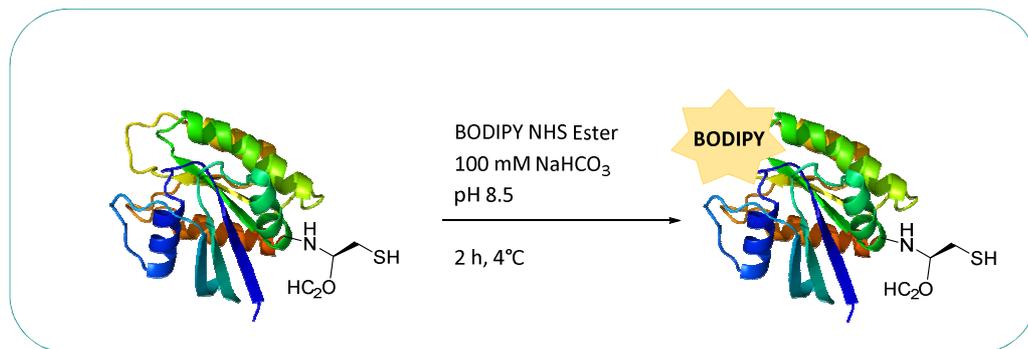


Abbildung 45: BODIPY Markierung des verkürzten *N*-Ras-Proteins ($\Delta 1-181$).

Für die eigentliche Ligation wurden jeweils 2 eq des jeweiligen Peptids in Methanol gelöst und nach Zugabe von Triton X-114 und dem markierten bzw. unmarkierten *N*-Ras-Protein ($\Delta 1-181$) in DTE-freiem Tris-Puffer (pH 7.4) über Nacht bei 4°C ligiert. Es ist wichtig, dass dabei das Peptid im doppelten Überschuss eingesetzt wird, da das Ras-Protein selbst noch drei weitere Cysteine (Cys-51,-80 und -118) besitzt, und bei dieser Reaktion eine selektive Ligation am Cystein-181 gewünscht ist. Nach vollzogener Michael-Addition des Thiols der C-terminalen Cysteinseitenkette an die Maleimidfunktion der Peptidsequenzen konnte das Protein mit Hilfe der Tritonextraktion erhalten werden. Dabei bedient man sich der Hydrophobizität des ligierten Proteins, welches auf Grund dieser Eigenschaften stark mit der Tritonphase wechselwirkt, sodass eine Anreicherung des Ligationsproduktes in der Tritonphase erreicht wird. Im Anschluss wird diese Tritonphase mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt, sodass das lipidierte Protein detergentenfrei erhalten werden kann (Abbildung 46).

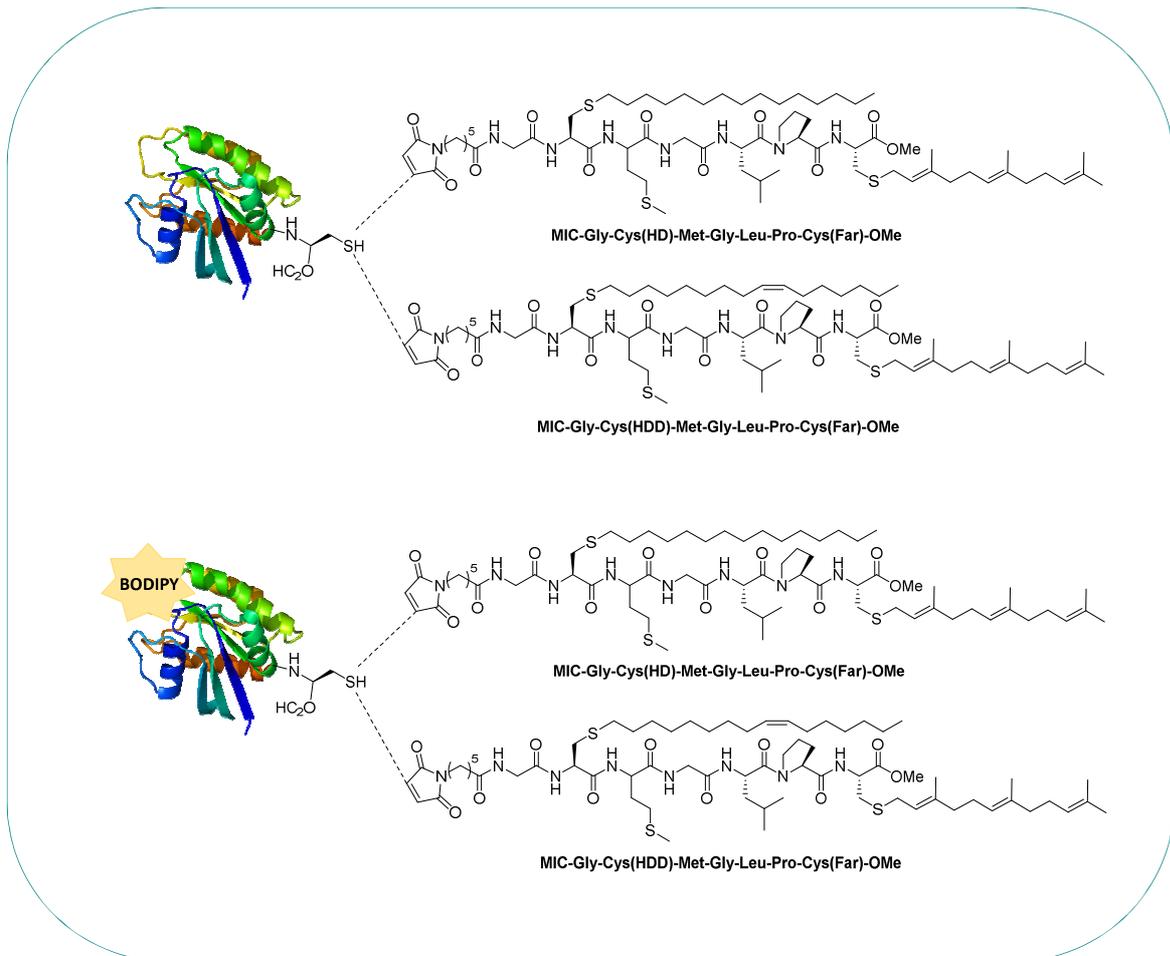


Abbildung 46: Übersicht der lipidierten, semisynthetischen Proteine für die biophysikalischen Untersuchungen.

Der Erfolg der Ligation wurde sowohl im SDS-Gel als auch mittels MALDI-TOF Analyse überprüft (Abbildung 47). Die Ligationsprodukte zeigten im Vergleich zum verkürzten *N*-Ras-Protein ($\Delta 1-181$) aufgrund ihrer höheren Masse eine kürzere Laufstrecke im Gel. Diese kürzere Laufstrecke zeigt sich für das MIC-HDD-FarOMe-Konstrukt in den Banden 2-4 und für das MIC-HD-FarOMe-Konstrukt in den Banden 5-6 im direkten Vergleich zu dem nicht ligierten *N*-Ras Konstrukt in den Banden 1 und 7. Auch bei den BODIPY-modifizierten *N*-Ras Konstrukten ließ sich eine verkürzte Laufstrecke für die zwei ligierten Konstrukte in den Banden 10 und 11 im Vergleich zu den nicht ligierten Ras-Varianten nachweisen.

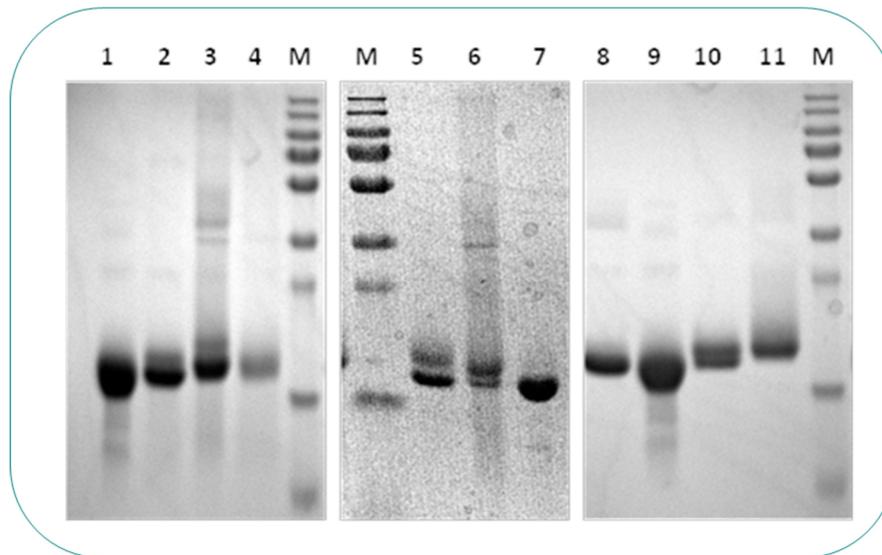


Abbildung 47: SDS-Gel als Kontrolle der Ligationen und Aufreinigungen der Konstrukte nach Coomassie-Färbung. M: Protein Marker; Bande 1: *N-Ras* wt. ($\Delta 1-181$); Bande 2: *N-Ras* wt. MIC-HDD-FarOMe P1; Bande 3: *N-Ras* wt. MIC-HDD-FarOMe P2; Bande 4: *N-Ras* wt. MIC-HDD-FarOMe P3; Bande 5: *N-Ras* wt. MIC-HD-FarOMe P1; Bande 6: *N-Ras* wt. MIC-HD-FarOMe P2; Bande 7: *N-Ras* wt. ($\Delta 1-181$); Bande 8: BODIPY-*N-Ras* wt. ($\Delta 1-181$); Bande 9: *N-Ras* wt. ($\Delta 1-181$); Bande 10: BODIPY-*N-Ras* wt. MIC-HDD-FarOMe P2; Bande 11: BODIPY-*N-Ras* wt. MIC-HDD-FarOMe P3.

Auch mittels Massenspektrometrie konnte die erfolgreiche Ligation überprüft werden (Abbildung 48).

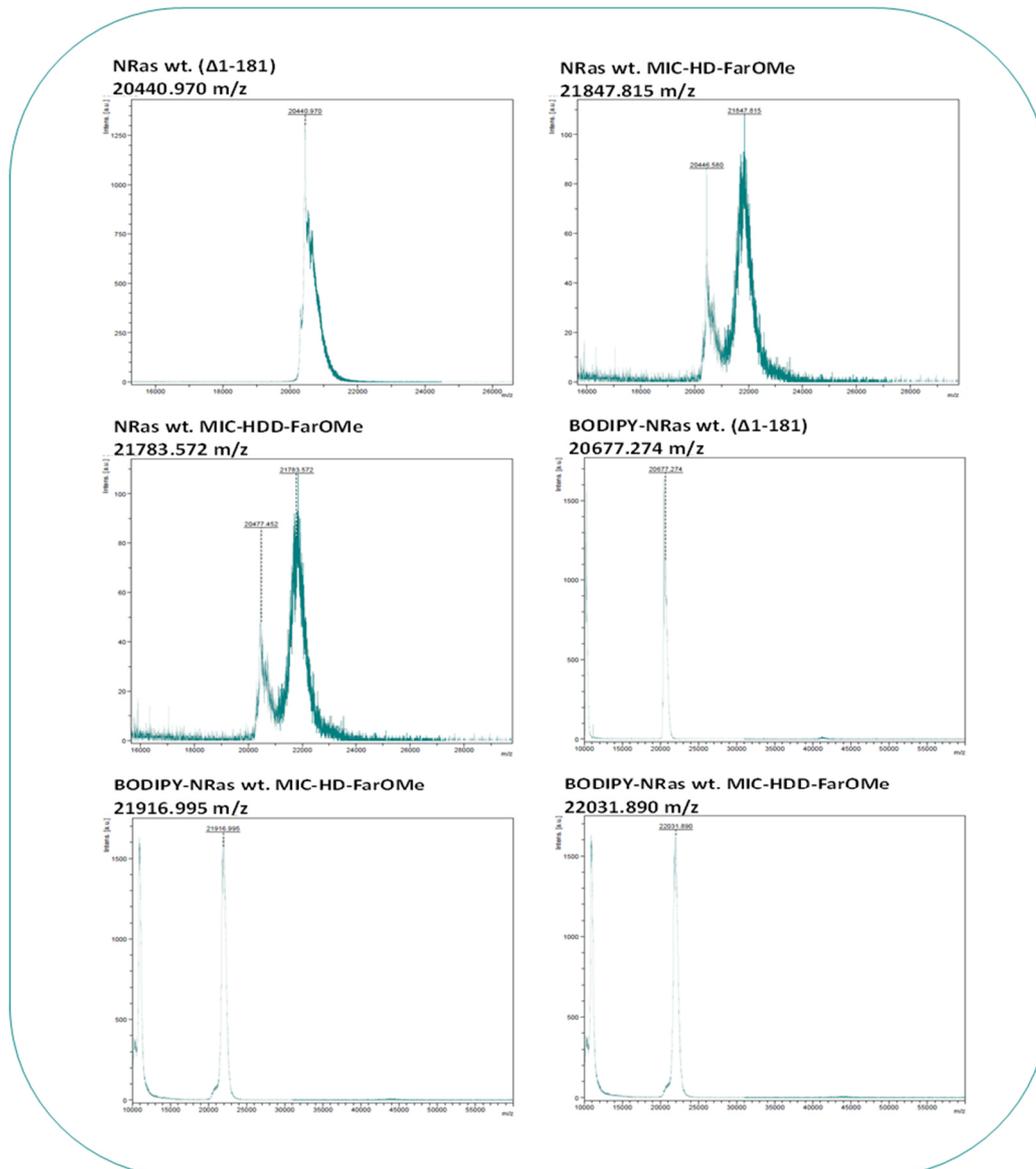


Abbildung 48: MALDI-TOF der MIC-ligierten N-Ras Konstrukte (Methode: LP 5-50 kDa).

Im Anschluss an die Charakterisierung mittels SDS-Page und MALDI-TOF wurden die semi-synthetischen Proteine aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und der Gruppe von Prof. Roland Winter für die biophysikalischen Analysen zur Verfügung gestellt.

4.11.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Im Jahre 1986 legten die Herren Gerd Binnig und Heinrich Rohrer die Grundlagen für die moderne Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy, AFM*)¹⁶⁵, wodurch sich erstmals die Oberflächenstrukturen von Isolatoren atomar auflösen ließen. Heutzutage gehört sie zu einer der Standardmethoden der Oberflächenphysik und findet ebenfalls Anwendung in den Werkstoffwissenschaften bis hin zu den Biowissenschaften. Das Prinzip des AFMs basiert dabei auf dem Abtasten einer Probenoberfläche mit Hilfe eines sogenannten Cantilevers, einer mikroskopisch kleinen Spitze, die an einem Federbalken fixiert ist. Der Anwendungsbereich einer typischen AFM-Messung liegt dabei zwischen wenigen Nanometern und einigen hundert Mikrometern. Mit Hilfe des AFMs lassen sich gleichzeitig die Topographie einer Probe sowie deren materialspezifischen Eigenschaften analysieren und bestimmen. Des Weiteren sind diese Aufnahmen sowohl im Vakuum,

in flüssigen Medien und auch an der Luft möglich, sodass das Prinzip auch auf lebende Zellen angewendet werden kann. Im Wesentlichen besteht das klassische AFM aus drei Teilen: dem Probenhalter (XY-Tisch), dem Scankopf (Cantilever) und der Detektionseinheit (Detektor und Steuerelektronik).

Die Hauptaufgaben des Probenhalters bestehen in der festen Halterung der Probe sowie der Bewegung dieser Probe in x- und y-Richtung unter der Spitze hindurch. Dazu werden in der Regel Piezoantriebe genutzt, die eine präzise Bewegung und somit das Abtasten der Probenoberfläche ermöglichen. Die Bewegung in z-Richtung erfolgt ebenfalls mittels Piezomotoren. Allerdings gibt es unterschiedliche Bauarten; so wird entweder die Probe oder der Scankopf selbst bewegt. Die Spitze des Scankopfs ist der wichtigste Teil der Apparatur. Sie sitzt am Ende eines ca. 0.1 mm langen, kleinen Federbalkens, hat typischerweise einen Durchmesser von 8-60 nm und besteht aus Silizium oder Siliziumnitrit (Abbildung 49).¹⁶⁵

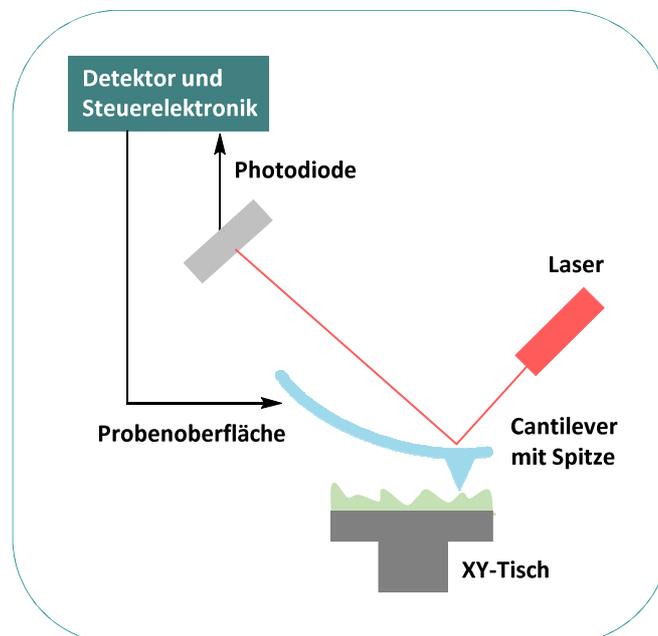


Abbildung 49: Grundprinzip eines AFMs: Die Probenoberfläche wird von einer Spitze abgetastet, dabei wird ein Laser, der auf das Ende des Federbalkens fokussiert ist, in eine segmentierte Photodiode reaktiert.

Das Prinzip des AFM lässt sich mit dem Abtasten einer rauen Oberfläche mit einem Finger vergleichen. Die Spitze wird mit einer Probe in Kontakt gebracht und über diese bewegt. Dabei folgt sie den Konturen der Oberfläche. Um die Bewegung des Federbalkens verfolgen zu können, wird ein Laserstrahl auf dessen Rückseite fokussiert und der reflektierte Strahl auf eine positionssensitive Photodiode (PSPD) zentriert, das sogenannte Lichtzeigerprinzip. Weitere, aber eher seltenere Methoden der Bewegungsdetektion des Federbalkens sind Kapazitätsmessungen und/ oder piezoresistive Methoden.¹⁶⁵

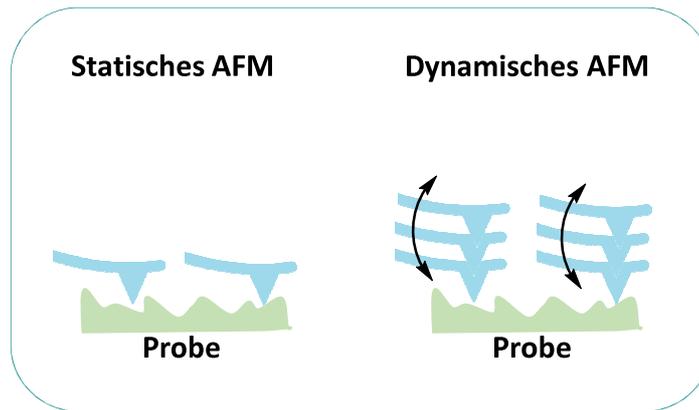


Abbildung 50: Skizze der Funktionsweise von statischem und dynamischem AFM.

Generell gibt es zwei grundsätzliche Betriebsarten in der AFM die sich sowohl in ihren theoretischen Grundlagen, als auch in ihren Anwendungsgebieten unterscheiden: das statische AFM und das dynamische AFM (Abbildung 50).

4.11.4.1 Statisches AFM

Bei dem statischen AFM (*contact mode, CM-AFM*) wird die Spitze des Scankopfes gegen die Oberfläche gedrückt und abgetastet. Dabei wird ein ständiger Kontakt zwischen Spitze und Probenoberfläche beibehalten, entweder auf einer konstanten Höhe (*constant height*) oder mit einer konstanten Kraft (*constant force*). Allerdings ist der Nachteil der Regelung auf eine konstante Höhe, dass die auf die Oberfläche übertragene Kraft von der Höhe des jeweiligen Rasterpunktes abhängt und sich die Probe dadurch verformen oder eingedrückt werden kann. Was wiederum zu starken Verfälschungen der Höheninformationen und somit des Messsignals führen kann. Daher greift man in den meisten Fällen auf das Prinzip der konstanten Kraft zurück. Die Einstellung einer konkreten Kraft erhält man über die Verbiegung des Federbalkens. Hält man diese konstant, so rastet die Spitze mit einer gleichbleibenden Kraft über die Oberfläche. Beide Varianten des statischen AFMs haben den Nachteil, dass abzubildende Strukturen durch die Spitze über die Oberfläche verschoben werden können, insbesondere bei weichen Oberflächen (Abbildung 50).¹⁶⁵

4.11.4.2 Dynamisches AFM

Bei dem dynamischen AFM wird der Federbalken zusammen mit der Spitze zu Schwingungen nahe der Resonanzfrequenz angeregt (Abbildung 50) und im Gegensatz zum statischen AFM berührungsfrei über die Oberfläche bewegt. Auch hier gibt es verschiedene Methoden: der sogenannte *non contact mode*, in dem die Spitze zu keinem Zeitpunkt die Probenoberfläche berührt und der *intermittent contact mode* (auch *tapping mode, TM-AFM*), indem die Spitze jeweils am Umkehrpunkt ihrer Schwingung die Oberfläche abtastet.¹⁶⁵

4.11.5 AFM von HD-NRas und HDD-NRas

Die zwei lipidierten N-Ras-Varianten HD-NRas und HDD-NRas wurden zur Untersuchung ihrer Membranlokalisation mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) gemessen. Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte in einer Kooperation mit der Winter-Gruppe der Technischen Universität Dortmund. Die Probe, die aus einer Lipiddoppelschicht mit coexistierenden I_o- und I_d-Domänen (geordnete und ungeordnete Phase) auf einem Schichtsilikat (Glimmerblättchen, *mica*) bestand, wurde zu Beginn jedes *TM-AFM*-Experiments untersucht. Für eine zeitabhängige Studie

wurde das jeweilige *N-Ras*-Protein direkt in die AFM-Fluidzelle injiziert und zur Analyse der Membranlokalisierung wurde der exakt gleiche Bereich der Lipiddoppelschicht vor und nach dem Einbau des Proteins untersucht.

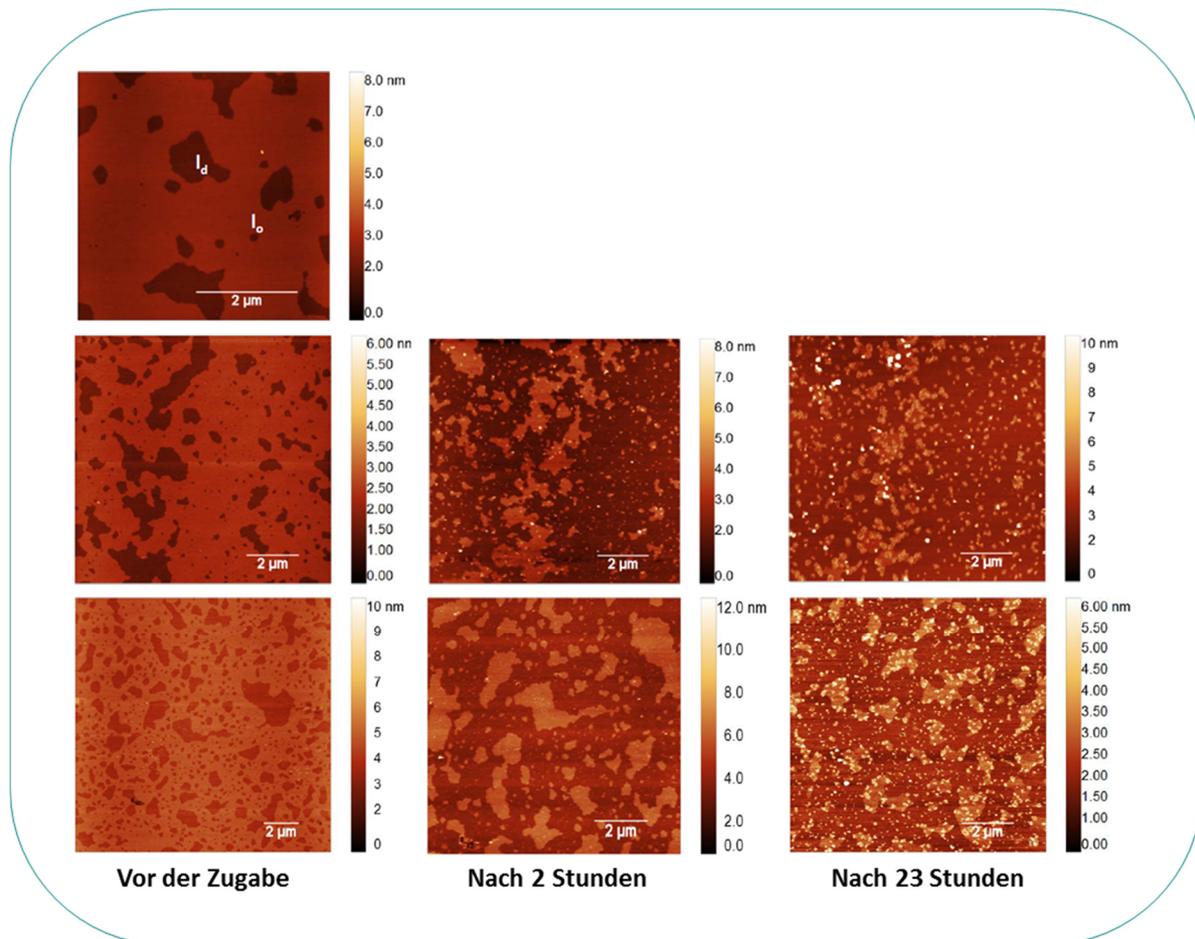


Abbildung 51: AFM Messung des NRas-HD Konstruktes vor der Zugabe (links), nach 2 Stunden (Mitte) und nach 23 Stunden (rechts).

Es zeigte sich, dass HD-NRas bereits nach zwei Stunden (Abbildung 51) komplett die ungeordnete Phase (I_d) besetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 21 Stunden konnte zusätzlich eine Ansammlung des *N-Ras*-Derivates im Zwischenraum der geordneten und ungeordneten Phase festgestellt werden. Dieses Verhalten war zu erwarten und ist bereits aus früheren Studien bekannt.^{166,167} Dort zeigten *N-Ras*-Proteine, die mindestens einen Farnesyl-Anker tragen, eine zeitabhängige Diffusion und eine darauffolgende Ansammlung im I_o/I_d -Phasengrenzbereich.^{166,167}

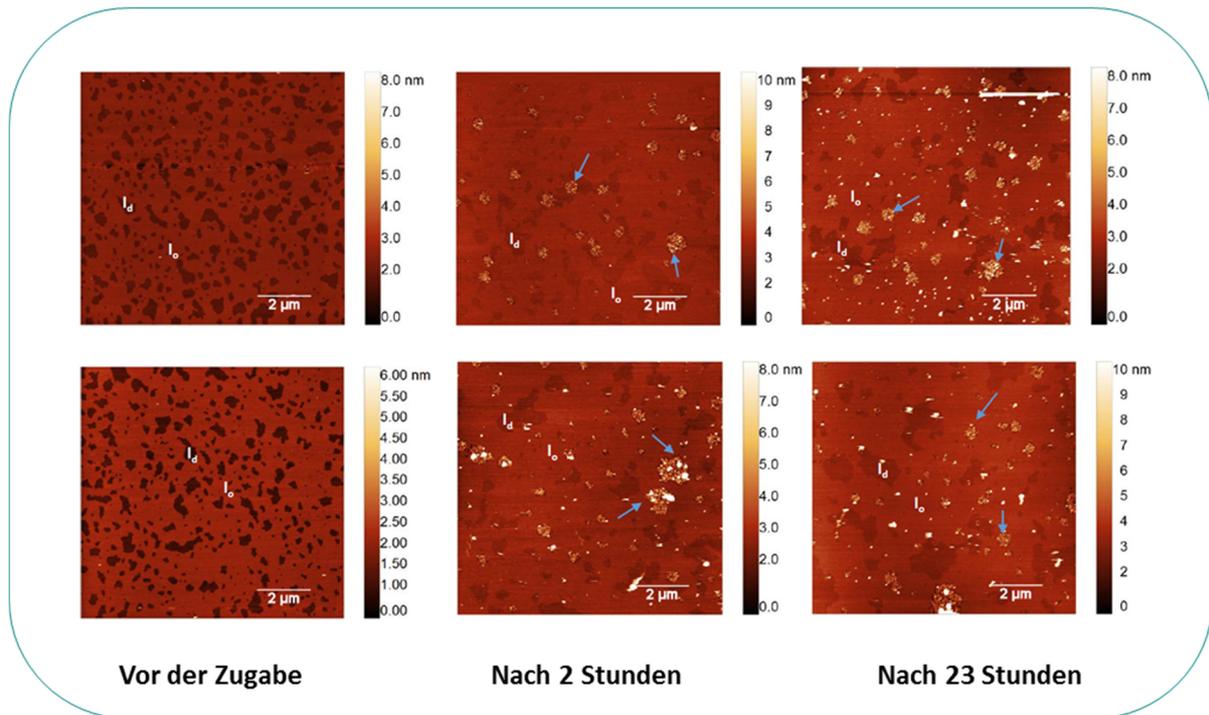


Abbildung 52: AFM Messung des NRas-HDD Konstruktes vor der Zugabe (links), nach 2 Stunden (Mitte) und nach 23 Stunden (rechts).

Im direkten Vergleich dazu zeigte HDD-NRas ein etwas anderes Verhalten, welches eher der K-Ras Spezies ähnelt (Abbildung 52). Zwar besetzt auch diese Ras-Spezies bereits nach zwei Stunden zuerst die ungeordnete Phase (I_a); allerdings zeigte die HDD-Variante ein anderes Verhalten nach einer weiteren Inkubation von 21 Stunden, nämlich die Bildung von neuen Domänen mit akkumuliertem Protein innerhalb einer fluidähnlichen Umgebung.^{166,167} Die erhöhte Domänenstärke lässt sich durch eine engere Packung der Ras-Moleküle über eine unterschiedliche Orientierung des Proteins gegenüber der Membranschnittstelle erklären. Interessanterweise sind diese neu gebildeten Domänen über den gesamten Zeitbereich stabil, während die Lipide in der angereicherten I_a -Phase noch eine hohe laterale Beweglichkeit aufweisen.

4.11.6 Kinetische Studien

Für die kinetischen Interaktionsstudien zwischen Vesikeln und den modifizierten *N*-Ras Proteinen, wurde der Kernbereich der Ras-Proteine mit dem fluoreszierenden Molekül BODIPY markiert. Für die Studien wurde die Interaktion zwischen dem Bodipy-markierten *N*-Ras und den Rhodamin markierten Vesikeln (DOPC/DPPC/Chol(1:2:1)+ Rhodamin DHPE) als FRET-Paar untersucht.

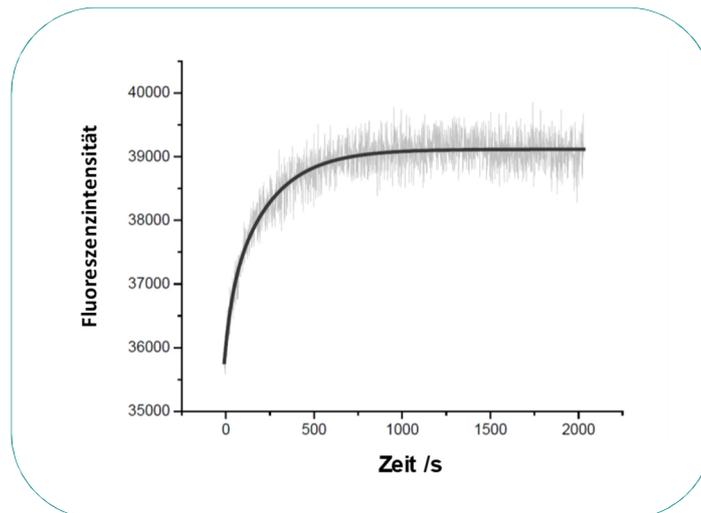


Abbildung 53: Kinetische Studie nach Zugabe von BODIPY-markiertem *N*-Ras zu Rh-Vesikeln.

Dazu wurde die Erhöhung des FRET-Signals nach der Zugabe des Ras-Proteins zu den Rh-Vesikeln in Abhängigkeit zur Zeit aufgenommen, um eine kinetische Assoziationskurve zu erhalten. Diese Kurve wurde anschließend gefittet, um die Bindungskonstanten K_1 und K_2 (Tabelle 6) zu erhalten. Die beste Annäherung an die Messdaten erfolgte mit Hilfe des 2-Schritt-Modells, d.h. es liegen sowohl ein langsamer K_1 als auch ein schneller Bindungsprozess K_2 vor.

Tabelle 6: Überblick der kinetischen Studien, K_1 - und K_2 -Werte.

	K_1 [ms^{-1}]	K_2 [ms^{-1}]
NRas-HDD	14.8 ± 4.81	71.0 ± 17.42
NRas-HD	5.5 ± 0.94	34.9 ± 9.04

Für das ungesättigte *N*-Ras-Protein zeigte sich in beiden Prozessen eine schnellere Umsetzung. Die Anwesenheit des ungesättigten Lipidankers scheint somit die Umsetzungsrate zu erhöhen und Bindung zu beschleunigen, was für eine erniedrigte Aktivierungsenergie spricht.

5 Zusammenfassung

Mit dem passenden Hydroxylamin-Linker (FITC-Linker) konnten nach den ersten Testversuchen mit Palmitoylierten-Bausteinen erfolgreich die Fettsäuren acylierter Proteine mittels Immunopräzipitation als auch aus Zelllysaten mit Hilfe der Massenspektroskopie identifiziert und quantifiziert werden. Damit das MS-basierte Verfahren für eine effiziente Trennung und Detektion der potentiell gebildeten Hydroxamate genutzt werden konnte, wurden zuvor eine Reihe von Hydroxamaten als Referenzverbindungen synthetisiert. Zu diesen Fettsäuren gehörten: Lauryl (12:0), Myristoyl (14:0), Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1), Archin (20:0) und Arachidon (20:4). Um sowohl Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge als auch Fettsäuren mit unterschiedlichen Sättigungsgraden zu untersuchen. Die Linearität und Robustheit des Signals wurde unter Verwendung von seriell verdünnten Proben und mit einem Massentoleranzfenster von 5 ppm bestimmt. Die nicht-natürliche Heptadecansäure (C17:0) wurde als Interner Standard genutzt mit der die Probe in einer bekannten Konzentration versetzt wurde. Das entwickelte System zeigte eine ausgezeichnete Empfindlichkeit mit einer unteren Nachweisgrenze von 0.05 pmol für die getesteten Referenzen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass S-verknüpfte Fettsäuren identifiziert und quantifiziert werden können, sollte untersucht werden, ob dieses Verfahren auch zur Identifizierung endogener S-Acylokette verwendet werden kann. In einer ersten Studie wurde daher das Proteom von HEK293-, HeLa- und N2a-Zellen hinsichtlich ihrer Lipidmuster verglichen

Nach der Quantifizierung der extrahierten Fettsäurehydroxamate zeigten sich eine gewisse Diversität der Fettsäurezusammensetzung sowie wesentliche zelltypspezifische Unterschiede. In HEK293- und HeLa-Zellen waren die häufigsten Proteine mit Palmitin-, Palmitolein-, Myristoyl- und Oleinsäuren S-acyliert. Im Gegensatz dazu enthalten N2a-Zellen geringere Anteile von Palmitin- und Palmitoleinsäure, wohingegen die in diesen Zellen nachgewiesene Menge an Stearin- und Oleinsäuren deutlich höher war als der anderen zwei Zelllinien. In allen Fällen konnten nur geringe Mengen der Arachin- und Linolsäure beobachtet werden, während kein Signal der Modifikation mit Laurin- und Arachidonsäure nachgewiesen werden konnte.

Um die Methode zu validieren, wurde die Spezifität des FITC-Linkers und der bisher erzielten Ergebnisse in zwei unabhängigen Experimenten getestet. Im ersten Experiment wurde der kommerziell erhältliche Inhibitor 2-Bromopalmitat eingesetzt, um die Proteinacyltransferasen (PATs) zu hemmen. Dabei zeigte sich klar, dass nur das Massensignal des Internen Standards einen Ausschlag zeigte, wohingegen die Signale der anderen Acylierten-Lipide keinen quantifizierbaren Wert aufwiesen. Die Inkubation mit 50 μ M des 2-BP-Inhibitors über 30 Minuten war also ausreichend um eine Acylierung der Proteine innerhalb der Zelllysate mit den gesuchten Lipidresten zu unterbinden. In einem zweiten Versuch wurden die Zellen vor der Ernte mit einer nicht-natürlichen C-19 Fettsäure behandelt und deren Aufnahme überprüft. Es zeigte sich, dass nach der Inkubation der Zellen mit der nicht-natürlichen Nonadecansäure (C19:0), das entsprechende Fettsäurehydroxamat in allen drei getesteten Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

Ermutigt durch die hohe Empfindlichkeit der bisherigen Studien, wurde das Konzept weiter auf die Analyse von Fettsäuren ausgewählter acylierter Proteine angewendet. Als Testprotein wurde die kleine GTPase N-Ras ausgewählt. Mit diesem Ziel wurden HEK293- und N2a-Zellen mit einem Vektor, der HA-N-Ras bzw. eGFP-N-Ras trägt, stabil transfiziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die *N*-Ras-Spezies in beiden Zelllinien sowohl mit Palmitinsäure (C16:0) als auch Palmitoleinsäure (C16:1) modifiziert waren, während keine Spuren anderer Fettsäuren nachgewiesen werden konnten. Die entwickelte Methodik ermöglicht also die effiziente Detektion *S*-verknüpfter Fettsäuren aus Zelllysaten und isolierten Proteinen. Dieser Ansatz könnte für die Entschlüsselung der pleiotropen Effekte von Inhibitoren der Proteinacylthioesterasen APT1 und APT2 von unschätzbarem Wert sein und ihre Substratspezifitäten charakterisieren. Um die Auswirkung dieser beiden Proteine auf Zellen zu untersuchen wurden im Weiteren Inhibitoren auf das gesamte Zelllysate sowie auf das Modellprotein *N*-Ras getestet.

In einem direkten Vergleich der zwei Inhibitoren zu der Gesamtheit der Fettsäuren aus den nicht behandelten HEK293-Zellen, zeigten ML348 und ML349 eine ähnliche Auswirkung auf die Verteilung der Lipidreste innerhalb der Zellen. Die Menge an detektierter Fettsäure erhöhte sich leicht in Zellen, die mit ML349 und ML348 behandelt wurden. Nach der Immunopräzipitation des Modellproteins *N*-Ras zeigten ML348 und ML349 ähnliche, jedoch signifikante Effekte für die Lipide der Zellen.

Um zu untersuchen, ob die Proteine direkt mit der Palmitoleinsäure des CoAs acyliert werden, oder ob evtl. ein anderer Mechanismus für die Bildung der Palmitoleinsäure verantwortlich ist, wurden die Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Inhibitor (CAY10566) der Stearoyl-CoA-Desaturase SCD1, behandelt. Nach der Inkubation mit dem SCD1-inhibitor ließ sich eine signifikante Reduktion der Palmitolein- und Ölsäure feststellen. Insgesamt scheint die Hemmung der Desaturase allerdings nicht ausreichend zu sein, um die Bildung von Proteinen mit diesen Modifikationen komplett zu verhindern.

Auf der Suche nach weiteren möglichen Desaturasen, fanden wir in der Literatur immer wieder den Hinweis auf eine mögliche Desaturasefunktionlität des sogenannten CLN3-Proteins. Die Option, dass CLN3 die Funktion einer *S*-verknüpften Palmitoyl-Protein Δ^9 -Desaturase besitzen könnte und somit Doppelbindungen in *S*-palmitoylierte Cysteine in Proteinen einbringen könnte, wurde durch weitere Studien untersucht.

In unseren Studien konnten wir überzeugende Beweise dafür finden, dass CLN3 in der Tat eine neuartige Fettsäure-Desaturase-Funktion besitzen könnte. Die Lipidzusammensetzung des Proteoms in CLN3 stabil transfizierten Zellen wurde in einem ersten Schritt nach Inkubation mit einer ^{13}C -markierten Palmitinsäure und die Umwandlung in die dazugehörige ^{13}C -markierte Palmitoleinsäure untersucht. Dabei zeigte sich ein Umsatz der gesättigten in die einfach-ungesättigte ^{13}C -markierte Fettsäure. Um die Ergebnisse zu verifizieren sollte in naher Zukunft das aufgereinigte CLN3-Protein, sowie Lymphoblastenzelllinien von erkrankten Patienten, in einem weiteren Assays untersucht werden.

Allgemein verleiht die *S*-Acylierung dem modifizierten Protein zwei wesentliche Eigenschaften: Hydrophobie und die Affinität für cholesterinreiche Membranen. Die Hydrophobie von Proteinen ist von grundlegender Bedeutung für ihre reversible Membranbindung sowie für die Regulierung der Membran-Assoziation. Dennoch ist noch nicht viel darüber bekannt, ob der Sättigungsgrad dieser Ketten Auswirkungen für die Lokalisierung der betreffenden Proteine hat. Aber es ist davon auszugehen, dass die Addition von gesättigten bzw. ungesättigten Acylketten einen deutlichen Einfluss auf die Membranpartitionierung und anschließende Funktion der Proteine in der Zelle hat. Weiterhin könnte auch die Stärke der Membranverankerung durch den Sättigungsgrad der Acylkette beeinflusst werden. Die zwei lipidierten *N*-Ras-Varianten HD-NRas und HDD-NRas wurden zur Untersuchung ihrer

Membranlokalisation mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) gemessen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass HD-NRas bereits nach 2 Stunden komplett die ungeordnete Phase (I_d) besetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 21 Stunden konnte zusätzlich eine Ansammlung des NRas-Derivates im Zwischenraum der geordneten und ungeordneten Phase festgestellt werden. Im direkten Vergleich dazu zeigte HDD-N-Ras ein etwas anderes Verhalten, welches eher der K-Ras Spezies ähnelt. Zwar besetzt auch diese Ras-Spezies bereits nach 2 Stunden zuerst die ungeordnete Phase (I_d); allerdings zeigte die HDD-Variante ein anderes Verhalten nach einer weiteren Inkubation von 21 Stunden, nämlich die Bildung von neuen Domänen mit akkumuliertem Protein innerhalb einer fluidähnlichen Umgebung. Die erhöhte Domänenstärke lässt sich durch eine engere Packung der Ras-Moleküle über eine unterschiedliche Orientierung des Proteins gegenüber der Membranschnittstelle erklären. Interessanterweise sind diese neu gebildeten Domänen über den gesamten Zeitbereich stabil, während die Lipide in der angereicherten I_d -Phase noch eine hohe laterale Beweglichkeit aufweisen. Für die kinetischen Interaktionsstudien zwischen Vesikeln und den modifizierten N-Ras-Proteinen, wurde der Kernbereich der Ras-Proteine mit dem fluoreszierenden Molekül BODIPY markiert. Für die Studien wurde die Interaktion zwischen dem Bodipy-markierten N-Ras und den Rhodamin markierten Vesikeln (DOPC/DPPC/Chol(1:2:1)+ Rhodamin DHPE) als FRET-Paar untersucht. Für das ungesättigte N-Ras-Protein zeigte sich in beiden Prozessen eine schnellere Umsetzung. Die Anwesenheit des ungesättigten Lipidankers scheint somit die Umsetzungsrate zu erhöhen und Bindung zu beschleunigen, was für eine erniedrigte Aktivierungsenergie spricht.



Teil 02:
Azido-Ceramid Derivate
zur proteomweiten Identifizierung
neuer C16-Ceramid bindender Proteine

6 Theoretischer Hintergrund

Aus der laufenden Katalogisierung von Lipidstrukturen (Lipidomik) wird klar, dass eukaryotische Zellen erhebliche Ressourcen bei der Erzeugung von Tausenden von verschiedenen Lipiden investieren.¹⁶⁸ Dabei stellt sich die Frage, warum Zellen ungefähr 5% ihrer Gene dazu verwenden, um diese Vielfalt an Lipiden zu synthetisieren. Die grundlegende biologische Maxime, die "Struktur unterliegt der Funktion" impliziert, dass es evolutionäre Vorteile geben muss, die davon abhängen, ein komplexes Lipidrepertoire zur Verfügung zu haben. Obwohl wir heutzutage die spezifischen Funktionen von zahlreichen Lipiden verstehen, bleibt die volle Definition des Nutzens des eukaryotischen Lipidrepertoires unklar.¹⁶⁹ Lipide erfüllen drei allgemeine Funktionen. Erstens dienen Lipide wegen ihres relativ reduzierten Zustandes zur Speicherung von Energie. Dabei liegen sie vor allem als Triacylglycerinester und Sterylester in Lipidtröpfchen vor. Diese dienen primär als wasserfreie Reservoirs für die effiziente Lagerung von Kalorienreserven sowie als Lager von Fettsäure- und Sterol-Komponenten, die für die Membran-Biogenese benötigt werden. Zweitens wird die Matrix der Zellmembranen selbst durch polare Lipide gebildet, die aus hydrophoben und hydrophilen Teilen bestehen. Die Neigung der hydrophoben Einheiten zur Selbstassoziation (entropisch durch Wasser angetrieben) sowie die Tendenz der hydrophilen Motive, mit wässrigen Umgebungen und untereinander zu interagieren, bildet die physikalische Basis der spontanen Bildung von Membranen.¹⁶⁹ Diese Kompartimentierung ermöglicht eine Segregation spezifischer chemischer Reaktionen und eine eingeschränkte Verbreitung der Reaktionsprodukte. Neben der Barrierefunktion bieten die Lipide der Membranen Charakteristika, die für die Zellteilung, die Reproduktion und den intrazellulären Membrantransport biologisch essentiell sind. Drittens können Lipide als Botenstoffe in der Signaltransduktion und in molekularen Erkennungsprozessen wirken.¹⁶⁹

Die Hauptlipide eukaryotischer Zellmembranen sind Glycerophospholipide, Cholesterol und Sphingolipide, zu denen Phospho- und Glycosphingolipide gehören. Insgesamt umfasst die Sphingolipid-Familie mehr als 4000 verschiedene Arten, die integrale Bestandteile der Zellmembranen sind und eine große regulatorische Rolle im Zellwachstum und für die Funktion der Zellen spielen. Sphingomyelin ist einer der Hauptvertreter der Sphingolipide, deren Gesamtanteil ca. 1-2 % der eukaryotischen Zellmembranen ausmacht.¹⁶⁹ In der menschlichen Haut liegt dieser Anteil sogar bei 18 %.¹⁷⁰ Die Funktion dieser Moleküle blieb für eine lange Zeit rätselhaft. Aber in den Jahren der Forschung glaubte man immer mehr an die strukturgebende Eigenschaft dieser Lipide, insbesondere im Aufbau von Zellmembranen. Schließlich führte die Entdeckung der Hemmung der Proteinkinase C (PKC) durch Sphingosin¹⁷¹ zu der Hypothese, dass Sphingolipide auch als intrazelluläre Botenstoffe fungieren.^{172,173} Aus diesem Grunde gilt heutzutage das Forschungsinteresse den Sphingolipiden Ceramid, Ceramid-1-phosphat, Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat.¹⁷⁴

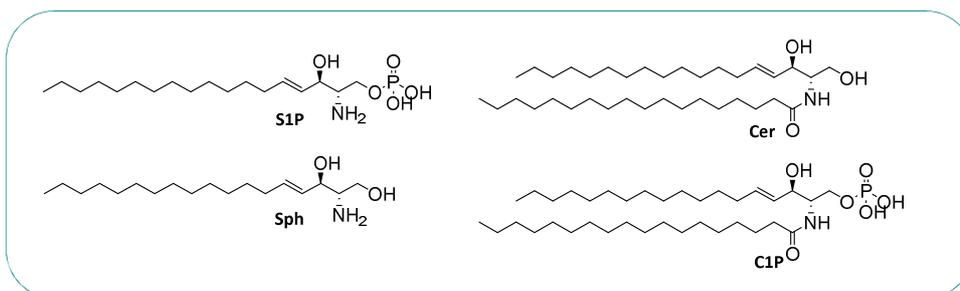


Abbildung 54: Strukturen ausgewählter wichtiger eukaryotischer Lipide und Lipid Botenstoffe. Sphingosin (Sph), Sphingosin-1-phosphat (S1P), Ceramid-1-phosphat (C1P) und Ceramid (Cer).

Die Ceramide selbst bekommen ferner immer größere Aufmerksamkeit, da sie eine wichtige Aufgabe in der Initiation einer koordinierten Stressantwort der Zellen einnehmen, die beispielsweise zur Wachstumshemmung, einem gehemmten Anabolismus bis hin zur Apoptose führen kann.¹⁷⁵

Sphingolipide werden nicht nennenswert aus Nahrungsquellen aufgenommen. Sie werden aus den Abbauprodukten gesättigter Fette (z.B. Palmitat) und Proteinen (z.B. Serin) hergestellt. Diese Substrate durchlaufen einen allgegenwärtigen Biosyntheseweg, der vier evolutionär konservierte Reaktionen enthält (Abbildung 55).¹⁷⁶ Einmal im ER erzeugt gelangen die Ceramide und Dihydroceramide zum Golgi, wo sie in komplexe Sphingolipide überführt werden können (beispielsweise Sphingomyeline/ Dihydrosphingomyeline, Glucosyl- und Galactosyl-Ceramide/ Dihydroceramide, etc.). Dies geschieht durch Zugabe von verschiedenen Kopfgruppen wie Phosphocholin, um Sphingomyeline zu erzeugen oder durch Zucker, um Glucosylceramide, Cerebroside und Ganglioside zu erzeugen. Das Ceramid-Transferprotein (CERT1) transloziert zum Beispiel selektiv Ceramide zu Golgi-Domänen, um eine Umwandlung in Glucosylceramide zu ermöglichen. Der sogenannte Rettungssignalweg (*Salvage pathway*) ermöglicht die Rückgewinnung von Ceramiden aus komplexen Sphingolipiden. In Plasmamembranen hydrolysieren neutrale Sphingomyelinasen (SMases) die Phosphocholine von den Sphingomyelinen und wandeln sie wieder in Ceramid und freies Cholin um (Abbildung 55)¹⁷⁷ In Lysosomen konvertieren saure Formen der SMase und die β -Glucosidase 1, Sphingomyelin und Glucosylceramide jeweils in Ceramid, welches weiter durch Ceramidasen deacyliert werden kann, um Sphingosin zu erzeugen und es dazu zu befähigen wieder in den *de novo*-Syntheseweg einzusteigen.¹⁷⁸

Die Ceramid-Biosynthese beginnt im ER mit der Kondensationsreaktion von Palmitoyl-CoA und Serin, die durch das multimere Enzym Serin-Palmitoyltransferase (SPT) katalysiert wird um 3-Ketosphinganin (Abbildung 55) zu erzeugen. Das Enzym SPT ist aus zwei wesentlichen Untereinheiten (SPTLC1 und 2) zusammengesetzt, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Gelegentlich kann dieses Enzym alternative Aminosäuren verwenden (Alanin und Glycin), um Deoxysphingolipide zu erzeugen, die allerdings schädlich für Neuronen sind. Mutationen, die die Substratspezifität von SPT verändern, führen zur anomalen Akkumulation dieser Deoxysphingolipide und anschließend zu der Entwicklung einer seltenen erblichen sensorischen Neuropathie.¹⁷⁹ Die Einbeziehung einer dritten SPTLC-Untereinheit erweitert die Spezifität für Acyl-CoAs (beispielsweise Myristoyl-CoA), was die Erzeugung verschiedenster Kettenlängen ermöglicht. Das 3-Ketosphinganin, welches durch die SPT Reaktion erzeugt wird, ist ein kurzlebiges Zwischenprodukt, das schnell zu Sphinganin durch die 3-Ketosphinganine Reduktase (3KSN) umgesetzt wird. Die anschließende *N*-Acylierung von Sphinganin durch eine Familie von Ceramid-Synthasen (CERS1-6) erzeugt Dihydroceramide und ein großer Teil der Vielfalt der Sphingolipid-*Pools* resultiert aus dieser Reaktion. Die sechs verschiedenen Säugetier-CERS produzieren Dihydroceramide mit variablen Acyl-Kettenlängen von 14 bis hin zu 34 Kohlenstoffatomen.¹⁸⁰ Diese Enzyme unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und Gewebeverteilung, was die Bildung von verschiedenen Sphingolipiden in verschiedenen Geweben und Zelltypen ermöglicht. Dihydroceramid Desaturasen (DES1 und 2) insertieren eine Doppelbindung in die Struktur des Dihydroceramides, dadurch verleiht dieses Enzym dem Sphingolipid viele seiner einzigartigen biophysikalischen Eigenschaften.¹⁸¹ DES1 ist das dominierende Enzym in den meisten Geweben. Durch DES2 werden Phytosphingolipide in der Haut und im Darm umgesetzt. Während bislang angenommen wurde, dass Dihydroceramide reine Zwischenprodukte der Ceramidsynthese darstellen, zeigen neuere Studien deutliche und nicht überlappende biologische Rollen mit dem häufiger vorkommenden Ceramid.¹⁸²

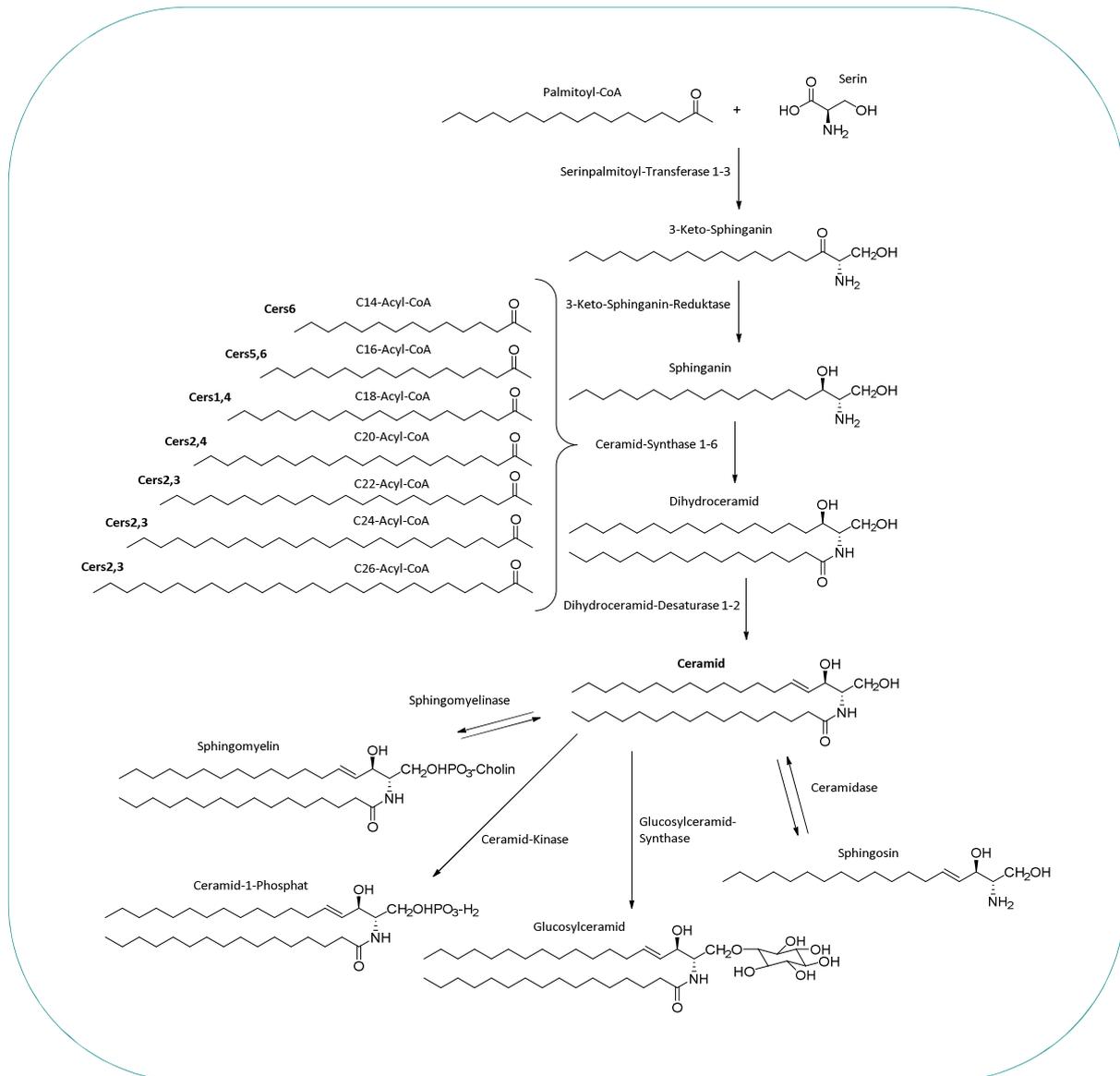


Abbildung 55: Schematische Darstellung der drei unabhängigen Signalwege, die Ceramide synthetisieren: die *de novo* Synthese, die Sphingomyelin Hydrolyse und der Rettungssignalweg.¹⁸³

Ceramid gilt als das zentrale Molekül des Sphingolipid-Stoffwechsels, welches die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen moduliert, die wiederum Einfluss auf die unterschiedlichsten Stoffwechselwege und Signalkaskaden nehmen. Zu diesen Prozessen gehören beispielsweise die Hemmung des Zellwachstums, die Induktion der Apoptose, die Förderung der Zelldifferenzierung, Prozesse der Zellalterung sowie entzündliche Reaktionen.¹⁸⁴ Insgesamt scheint ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Ceramid und seinen Gegenspielern, wie dem Sphingosin-1-phosphat sehr wichtig für die Homöostase der Gewebe zu sein. So scheinen Dysfunktionen des Ceramid-Levels für eine Vielzahl von Krankheiten wie AIDS, Autoimmunkrankheiten und maligne Erkrankungen verantwortlich zu sein.¹⁸⁵ Erhöhte Ceramidspiegel zeigen häufig eine toxische und proapoptotische Wirkung auf die betroffene Zelle¹⁸⁶ und könne so u.a. in Erkrankungen wie Diabetes mellitus und dem systemischem Lupus erythematodes gefunden werden. Aber auch zu geringe Ceramidkonzentrationen wirken sich schädlich auf die Zelle aus und können beispielsweise zur Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen, wie Parkinson und Alzheimer führen, da eine geregelte Zellproliferation und Differenzierung durch eine zu geringe Konzentration an Ceramiden nicht mehr gewährleistet werden kann.¹⁸⁷

Ferner können pathologisch verringerte Ceramid-Konzentrationen zum Arrest des Zell-Zyklus sowie zu einem undifferenzierten zellulären Phänotyp führen.¹⁸⁸

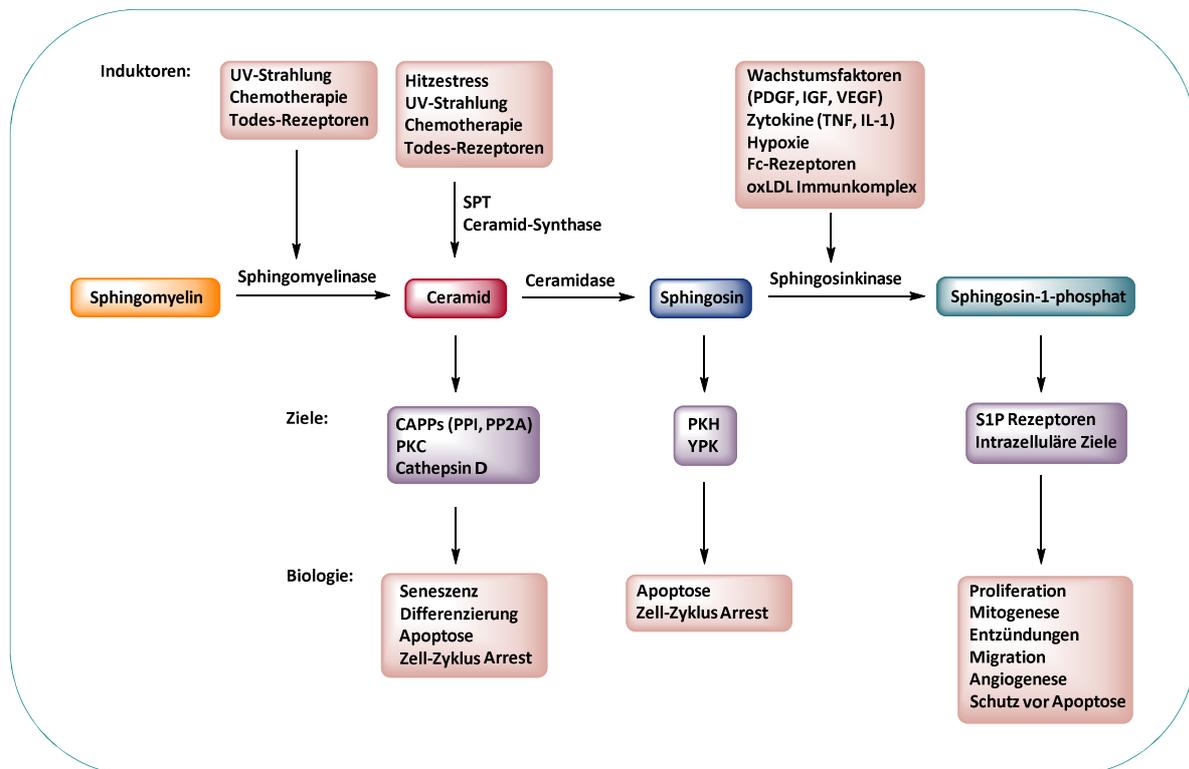


Abbildung 56: Schematische Darstellung über die Rolle der Sphingolipide. Beteiligung von Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat in zellbiologischen Prozessen. CAPP: ceramid-aktivierende Ser-Thr Phosphatase; IGF: Insulin-artiger Wachstumsfaktor, IL-1: Interleukin-1; oxLDL: oxidiertes geringe Dichte Lipoprotein; PDGF: *Platelet-derived growth factor*; PKC: Proteinkinase C; PKH: PKB Homologon; TNF: Tumornekrosefaktor; VEGF: vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor; YPK: Hefeprotein Kinase.¹⁸⁹

Wie bereits erwähnt, haben Ceramide und andere Sphingolipide als Lipid-Botenstoffe wichtige Funktionen innerhalb der Zellen. Sie wirken antiproliferativ, differenzierungsfördernd und spielen daher besonders in der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle. Der programmierte Zelltod ist neben Prozessen des Zellwachstums, der Zellteilung und der Differenzierung von Geweben eine der grundlegenden Prozesse, um die Homöostase des Organismus aufrechtzuerhalten (Details siehe 6.1).

Ferner haben Ceramide wichtige Funktionen für die Haut. Sie fungieren dabei sowohl als intrazelluläre Botenstoffe als auch als extrazelluläre Lipide, die die Hautbarriere bilden.¹⁹⁰ Unsere oberste, verhornte Hautschicht ist das sogenannte Stratum corneum, welches aus den Hauptlipidkomponenten Ceramid, Cholesterol sowie freien Fettsäuren aufgebaut ist.¹⁷⁰ Die Hauptfunktion des Stratum corneum ist der mechanische Schutz der Haut vor exogenen schädlichen Einflüssen und die Verhinderung einer Austrocknung. Diese mehrschichtigen, extrazellulär gelegenen Lipidlamellen, bestehen größtenteils aus komplexen, z.T. *O*-acylierten Ceramidspezies mit langen Fettsäureresten.¹⁹¹ Studien haben gezeigt, dass nach einer Störung der obersten Schichten der Epidermis die Synthese von Ceramiden und anderen Sphingolipiden ansteigt.¹⁹² Wie bereits erwähnt, ist der Anteil des Schlüsselenzyms der Ceramidsynthese, dem SPT, in der Epidermis viel höher als in anderen Geweben.¹⁹³ Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele epidermale Erkrankungen, wie beispielsweise die atopische Dermatitis, Ichthyosen und Psoriasis mit einem signifikant erniedrigten Ceramid-Gehalt einhergehen, wobei der genaue Defekt im Sphingomyelin-Metabolismus bisher noch ungeklärt bleibt.¹⁹⁰

Ceramide und Ceramid-Metabolite können also in zahlreiche Krankheiten, wie Diabetes, Herzerkrankungen und Adipositas identifiziert werden. Um diese Störungen zu beheben, ist es wichtig, die Enzyme dieser Prozesse sowie die Synthese der beteiligten Metaboliten zu entschlüsseln, um neue therapeutische Ziele zu entwickeln. Doch es bleiben noch viele offene Fragen.¹⁸³

6.1 Apoptose

In vielzelligen Organismen spielt der altruistische Selbstmord der Zelle eine wichtige Rolle. Im Laufe des Lebens muss der Zelltod die Zellproliferation ausbalancieren, insbesondere in Geweben mit einem hohen Umsatz, wie beispielsweise dem hämatopoetischen System und dem Darmepithel. Auch im Immunsystem müssen Zellen, die nutzlos oder gar gefährlich sind, weil ihre Antigenrezeptoren das eigene Gewebe erkennen und attackieren, beseitigt werden. Der programmierte Selbstmord der infizierten Zellen bietet somit eine Möglichkeit, die Ausbreitung von Erregern und Krankheiten einzugrenzen. Der Hauptprozess des programmierten Zelltodes, die sogenannte Apoptose, wurde erstmals morphologisch erkannt. Sowohl Kerne als auch das Zytoplasma, einschließlich der Mitochondrien, schrumpfen innerhalb der Zellen, die der Apoptose unterliegen, und die Zellinhalte werden typischerweise in sogenannten apoptotischen Körpern eingeschlossen, die von der Plasmamembran umgeben sind. Als Reaktion auf die *friss mich* Signale auf ihrer Oberfläche werden diese apoptotischen Körper rasch durch Phagozyten umschlossen und in ihren Lysosomen verdaut. Dieses System ist so effektiv, dass der Prozess des Zelltodes nicht besonders auffällt, selbst in Geweben, die normalerweise einen hohen Anteil an Apoptose aufweisen (beispielsweise der Thymus). Im Gegensatz dazu steht der passive Zelltod, die sogenannte Nekrose, die eine Schwellung der Mitochondrien und den Bruch der Plasmamembran auslöst, um entzündliche Zellinhalte, die zu einer Präsentation von Selbst-Antigenen in einer immunogenen Form führen könnten, auszulöschen.¹⁹⁴ Die ersten molekularen Einblicke in die Apoptose tauchten in den 1980er und 1990er Jahren auf. Das zuvor unbekannte Gen Bcl-2 wurde aus der Haltepunkt-Region einer rezidivierenden chromosomalen Translokation im menschlichen folliculären Lymphom identifiziert. In zahlreichen Studien führte die erzwungene Expression von Bcl-2 zu einem von hämatopoetischen Zellen ausgelösten Todes, der durch Zytokin Entzug initiiert und durch Lymphozytenakkumulation in Mäusen gefördert wurde und oft in Autoimmunerkrankung oder Krebs gipfelt. Biochemische Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die proteolytische Kaskade der Säugetiere, welche durch den Bcl-2 regulierten Signalweg beginnt, durch das Gerüstprotein APAF1 (Apoptotischer Protease aktivierender Faktor 1) als Reaktion auf Cytochrom c, welches von den Mitochondrien ausgeschüttet wird, eingeleitet wird.¹⁹⁴ Diese Kaskade zeigt ein evolutionär konserviertes, genetisches Programm, welches eine ordentliche (nicht-entzündliche) Entfernung von unerwünschten Zellen sicherstellt. Die nachfolgenden Erklärungen zum apoptotischen Prozess beziehen sich vor allem auf die der Wirbeltiere und sind somit auch von großer Bedeutung für die menschliche Pathologie. Der mitochondriale Signalweg (intrinsischer, Bcl-2 geregelter oder Stress-Signalweg) führt zum Tod der Zelle, indem die apoptotische Barriere durch Wechselwirkungen auf der mitochondrialen Außenmembran zwischen drei funktionell und strukturell unterschiedlichen Untergruppen der Bcl-2-Proteinfamilie: BH3 (Bcl-2-Homolog 3), den pro-Überleben Bcl-2-Proteinen selbst und den pro-apoptotischen Effektorproteinen BAX (Bcl-2-assoziiertes Protein X) und BAK (Bcl-2 Antagonist/ Killer), eingestellt wird (Abbildung 57).¹⁹⁴

Somit kann diese Familie als ein dreifacher-apoptotischer Schalter angesehen werden. Wenn genug BH3-Proteine in Reaktion auf verschiedensten zytotoxische Stress angeregt worden sind, kann die apoptotische Barriere überschritten werden und BAX und BAK beginnen Oligomere zu bilden, die eine Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran ermöglichen. Hierdurch werden apoptogene

Faktoren in das Zytosol ausgeschüttet, insbesondere Cytochrom c, welches die Aktivierung von apikal Caspase 9 auf APAF1 fördert. Die aktivierte Caspase 9 wiederum aktiviert die Effektorcaspasen.¹⁹⁴ Der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg, auch als extrinsischer Weg bekannt, wird ausgelöst, wenn bestimmte Mitglieder der TNFR-Familie (Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren) auf der Plasmamembran ligiert werden, was zur Aktivierung der Caspase-8 und anschließend zur Aktivierung der Effektorcaspasen führt (Abbildung 57).¹⁹⁴

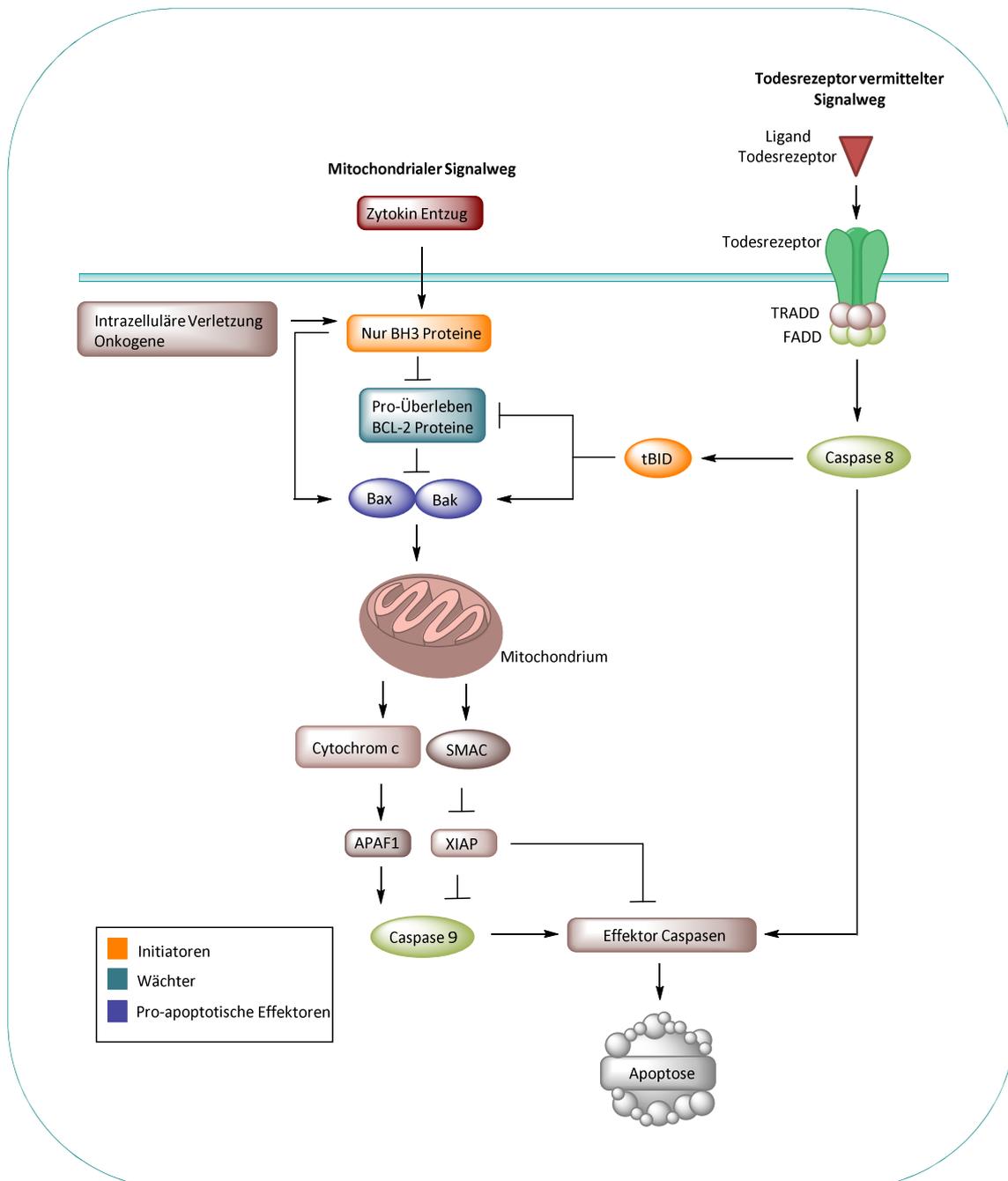


Abbildung 57: Der mitochondriale und Todesrezeptor-vermittelte Wege zur Apoptose. Diverse zytotoxische Stimuli, einschließlich onkogenen Stress und chemotherapeutische Mittel, wie auch Entwicklungsanzeichen, greifen in den mitochondrialen Weg, der durch die Bcl-2-Familienmitglieder reguliert wird, ein. Diese Reize aktivieren BH3-Familienmitglieder (Initiatoren), sorgen für die Hemmung der pro-Überleben Bcl-2-ähnlichen Proteine (Wächter), wodurch die pro-apoptischen Effektoren BAX und BAK aktiviert werden, die wiederum die mitochondriale Außenmembran zerstören. Cytochrom c fördert die Aktivierung der Caspase 9 auf dem Gerüstprotein APAF1 (Apoptotischer Protease aktivierender Faktor 1), während das freigesetzte Protein SMAC (zweiter Aktivator der Caspasen) den Caspase-Inhibitor XIAP (X-verknüpftes Inhibitor Apoptoseprotein) inhibiert. Der Todesrezeptor-vermittelte (oder extrinsische) Signalweg der

Apoptose wird aktiviert, wenn bestimmte Todesrezeptor-Liganden der TNF-Familie (wie der FAS-Ligand und TNF) ihre verwandten Todesrezeptoren (FAS und TNFR1, jeweils) auf der Plasmamembran binden, was zu einer Caspase 8 Aktivierung über FADD (FAS-assoziiertes Todesdomänen Protein) bzw. TRADD (TNFR-assoziiertes Todesdomänen Protein) führt. Zusätzlich kann die verkürzte Form des BID (tBID), welche durch die Caspase-8-vermittelte Proteolyse von BID erzeugt wird, in dem mitochondrialen Weg eingreifen um die apoptotische Reaktion zu verstärken. Dieser Verstärkungsmechanismus ist für die effektive Apoptose in bestimmten Zellen ("Typ 2"-Zellen), wie beispielsweise Hepatozyten, erforderlich, aber nicht in "Typ 1"-Zellen, wie Thymocyten. Der Gehalt an XIAP unterscheidet die beiden Zelltypen (höher bei Typ-2-Zellen). Diese zwei Signalwege konvergieren an Aktivierung der Effektorzellen Caspasen (Caspase 3, Caspase-7 und Caspase-6).¹⁹⁴

6.1.1 Die Rolle von Bax, Bcl-xL und LC3

Die Apoptose ist ein regulierter Prozess, bei dem unerwünschte oder beschädigte Zellen beseitigt werden. Die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOM) und der damit einhergehenden Freilassung von wichtigen Intermembranraum (IMS)-Proteinen, wie Cytochrom c, Smac/Diablo und dem Apoptose-induzierenden Faktor, ist ein irreversibler und entscheidender Schritt der Apoptose, der zur einer Aktivierung der beteiligten Effektor-Caspasen führt. Wie bereits erwähnt, wird der intrinsische Weg der Apoptose, ein Typ des programmierten Zelltodes, auf mitochondrialer Ebene durch die Bcl-2 Familie geregelt. Die Proteine der Bcl-Familienmitglieder haben überlebensfördernde Eigenschaften, zu ihnen zählen: Bcl-xL, Bcl-2 und Mcl-1, welche die Integrität der MOM in normalen Zellen erhalten und pro-apoptotische Mitglieder, wie Bax, Bak und Bid, die den apoptotischen Prozess initiieren und die IMS Proteinfreisetzung erleichtern, wenn die Zelle beschädigt ist oder ein apoptogenes Signal geliefert wird. Ob sich die anti-apoptotischen oder die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine durchsetzen, entscheidet, ob IMS-Proteine durch eine Pore durch die MOM freigesetzt werden und somit über das Schicksal der Zelle bestimmen.¹⁹⁵ Unabhängig von der Art der Freisetzung von IMS-Proteinen aus den Mitochondrien, muss dieser Vorgang strikt reguliert werden um einen unerwünschten Zelltod zu verhindern. Das bioaktive Ceramid, welches zur Familie der Sphingolipide gehört, ist eines dieser Regulationsmoleküle. Die Beteiligung von Ceramiden in der Apoptose wird allgemein anerkannt und es ist auch bekannt, dass sich der intrazelluläre Ceramid-Spiegel als Reaktion auf viele verschiedene apoptotische Stimuli erhöht. Insbesondere ist eine Erhöhung von Ceramiden in den Mitochondrien pro-apoptotisch.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ Die Erhöhung von Ceramiden in Mitochondrien kann durch mehrere Wege erfolgen^{200,201}, einschließlich durch den Transfer von Ceramiden aus mitochondria-assoziierten Membranen.²⁰² Während Bax /Bak-Knockout Zellen dafür bekannt sind, sehr resistent gegenüber Apoptose zu sein^{203,204}, wurde erst kürzlich gezeigt, dass dieser Widerstand von einem Defizit in der Ceramid-Bildung begleitet wird, indem Bak den Ceramid-Stoffwechsel durch die Aktivierung einer kritischen Ceramid-Synthase regelt, um das mitochondriale Ceramid-Level zu erhöhen.²⁰⁵ Während der Metabolismus von Ceramide zu anderen Verbindungen, wie beispielsweise Glucosylceramid, die Zellen widerstandsfähiger gegen Zytostatika zu machen²⁰⁶, kann eine Blockierung des Ceramid-Stoffwechsels zur Sensibilisierung von multiresistenten Zellen und somit zu deren Tode führen.²⁰⁷ Das *Steady-State-Niveau* von Ceramiden ist ein wichtiger Schritt im apoptotischem Programm einer Vielzahl von Zelltypen²⁰⁶ und zytotoxischer Stimuli^{197,198,207} und die Bildung von Ceramid-Kanälen kann bei diesen physiologischen Konzentrationen von Ceramiden in Säugetier- und Hefe Mitochondrien nachgewiesen werden.²⁰⁸ Ceramid-Kanäle konnten auch in Liposomen unter Verwendung von Transmissions-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden.²⁰⁹ Diese Strukturen sind stabil und haben gezeigt, dass sie groß genug sind, um alle bekannten IMS-Proteine aus den Mitochondrien während der Apoptose freizusetzen.²⁰⁸ Das aktuelle Modell des Ceramid-Kanals unterstreicht die strukturellen Merkmale, die wichtig für die Kanalbildung sind.²¹⁰ Das Amid-Stickstoff und die Carbonylgruppe ermöglichen die Bildung von Ceramid-Spalten. Benachbarte Ceramid-Spalten werden durch die C-1 und C-3 Hydroxygruppen gehalten, um das Lumen des Kanals

zu bilden. Die Länge der Kohlenwasserstoffketten der Ceramide, obwohl physiologisch wichtig^{211,212}, ist relativ unwichtig für die eigentliche Kanalbildung.²¹³ Die Sphingoidbase ist in der Regel 18 Kohlenstoffatomen lang und verfügt über eine C-4 = C-5 trans-Doppelbindung. Die Ceramid-Spezies in Säugerzellen haben Acylketten, die von 12 Kohlenstoffatomen bis hin zu 24 Kohlenstoffatomen reichen. Es ist wichtig dabei anzumerken, dass diese Ceramid-Kanäle sehr stabile, starre Strukturen sind, die durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden. Ceramid-Kanäle können durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert werden. Die überlebensfördernden Bcl-2-Mitglieder, Bcl-xL und CED-9 (Caenorhabditis Elegans Homolog von Bcl-2) haben bereits gezeigt, dass sie gegen die Kanalbildung wirken und vorgeformte Ceramid-Kanäle zerlegen können.²⁰⁸ Umgekehrt kann das pro-apoptotische Bcl-2-Mitglied, Bax, Ceramid-Kanäle direkt verbessern.¹⁹⁵ Physiologische Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Ceramide sowohl einen extrazellulären Stimulus haben, als auch als intrazellulärer Mediator^{189,214} der mitochondrialen Apoptose wirken können.²¹⁵ Bax selbst befindet sich im Zytosol oder ist lose mit der MOM in der monomeren Form verbunden. Im Zuge eines apoptotischen Signals inseriert Bax in die MOM und wird aktiviert und oligomerisiert. Aktiviertes Bax und /oder Bak werden für die Freigabe von Intermembranraum-Proteinen, die durch die Bildung von Kanälen in Zellen und in Phospholipid-Membranen gelangen, direkt verantwortlich gemacht.^{216,217} Doch ist es immer noch unklar, ob diese Kanäle groß genug sind, um die Freilassung aller IMS-Proteine zu ermöglichen.²¹⁸ In Säugerzellen wird Bax nicht für die Ceramid-induzierte Cytochrom c Ausschüttung benötigt^{219,220}, aber es ist bekannt, dass Bax den Prozess der Ceramid-induzierten Apoptose verbessert.²²¹ Zusätzlich wurde auch gefunden, dass Ceramide in Anwesenheit der MOM in der Lage sind monomeres Bax zu aktivieren.^{197,222} Fasst man diese Aussagen zusammen, so scheinen Bax und Ceramid kooperativ zu interagieren, um die MOMP zu generieren. Diese Befunde korrelieren allerdings nicht mit der Ansicht vieler Forscher. Legt man jedoch die bisherigen Ergebnisse aus veröffentlichten Experimenten zu Grunde, so wäre diese Aussage eine logische Schlussfolgerung.²¹⁵

Makroautophagie (hier: Autophagie) ist ein konservierter und allgegenwärtiger Mechanismus in eukaryotischen Zellen, um Materialien aus dem Zytoplasma zu Lysosomen über Membrankompartimente zu transportieren und zu recyceln. Im Initiationsschritt bildet sich ein abgeflachtes, kleines Vesikel im Zytoplasma und wächst zu einer becherförmigen Isolationsmembran, dem Phagophor, zusammen. Dieses Phagophor umschließt einen Teil des Zytosols und andere Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien. Dieses Gebilde schließt sich in einem weiteren Schritt, um das Doppel-Membran gebundene Autophagosom zu bilden. Die abschließende Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen resultiert in einem Abbau des sequestrierten Zytosols und der eingeschlossenen Organellen (Abbildung 58). Die Lysosomen können dann aus den Hybridorganellen reformiert werden.²²³ Fehlfunktionen des Systems stehen in Zusammenhang mit der Akkumulation von Zellschäden, in Krebs, neurodegenerativen Krankheiten und Alterung. Innerhalb des Mechanismus ist die Lipidierung des Signalpeptides LC3 von entscheidender Bedeutung für die korrekte Funktion der Autophagie. Bei Säugetieren wird das Atg8-Homolog LC3B-I mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert, um LC3B-II zu bilden, was zur Reifung von Autophagosomen führt, die mit den Lysosomen assoziieren und das Autophagolysosom bilden. Wie bereits erwähnt, fördert der Prozess der Autophagie das Überleben der Zellen insbesondere während Hungerphasen. Es kann allerdings auch den Tod der Zelle (tödliche Autophagie) einleiten. Allerdings sind die Mechanismen, durch welche die Autophagie das Überleben der Zelle fördert oder hemmt, noch unklar. Vor kurzem wurden Säugetier-Ceramid-Synthasen 1-6 (CerS1-6) gefunden, die die *de novo*-Synthese von Ceramiden mit spezifischen Acylfettsäuren regulieren.²²⁴ Innerhalb dieser Studien hat sich gezeigt, dass zum Beispiel CerS1 und

CerS6 bevorzugt C18- und C16-Ceramide erzeugen.^{225,226} Die von CerS1-6 generierten Ceramide nehmen dabei unterschiedliche biologische Rollen innerhalb der Zellen ein²²⁷⁻²²⁹, insbesondere CerS1 (C18-Ceramid) scheint als Tumorsuppressor in präklinischen und klinischen Studien nützlich zu sein.

230-232

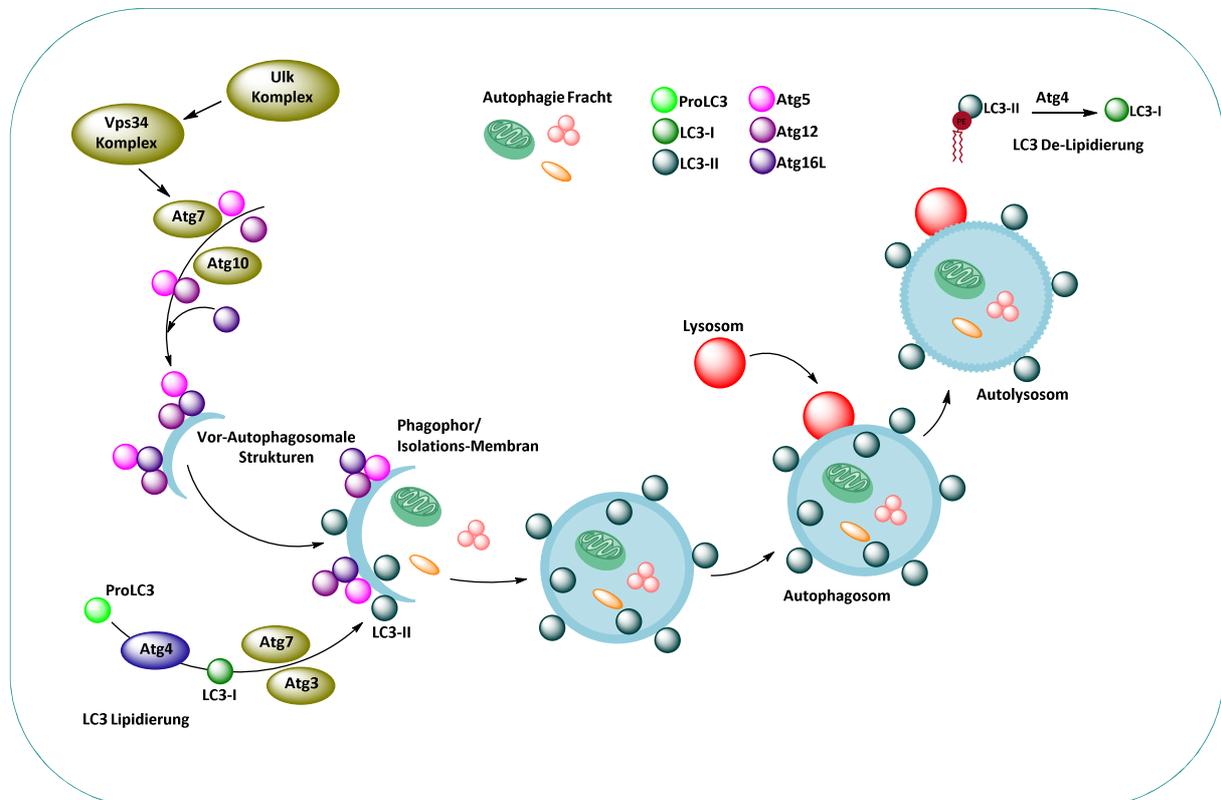


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Autophagie. In Säugerzellen, ist der ULK komplexe (bestehend aus ULK1/ 2-Atg13-FIP200-Atg101) verantwortlich für die Einleitung der Autophagie, in Reaktion auf bestimmte Signale. Die Bildung einer doppelagigen Membran im Zytosol erfordert die Einmischung des VPS34 Komplexes (VPS34-Vps15, Beclin-1-Barkor). Die Klasse III PI3K Aktivität dieses Komplexes ist für die Bildung des Phagophor erforderlich. Im nächsten Schritt werden der Atg12-Atg5-Atg16L Komplex und LC3-II an die sich verlängernde Membran durch die zwei konjugierenden Systeme hinzugefügt. Die Membran wächst um einen Teil des Zytoplasmas zu umhüllen, die Ausbildung des sogenannten Autophagosoms. Im letzten Schritt des Verfahrens, verschmelzen Lysosomen mit dem Autophagosom, wodurch lysosomale Hydrolasen in das Innere freigegeben werden, was den Abbau des Vesikelinhaltes zur Folge hat.²²³

Obwohl Ceramide und andere Sphingolipide in der Induktion der Autophagie bereits eine Rolle zugeschrieben wurde, sind die eigentlichen Mechanismen der Ceramid-Signalisierung in der Regulation der letalen Autophagie bisher noch nicht komplett verstanden. In einigen Studien wird jedoch davon ausgegangen, dass das C18-Ceramid die tödlich Autophagie über selektives Binden von Mitochondrien durch LC3B-II-haltige Autophagolysosome (Mitophagie) induziert.²³³ Diese direkte Interaktion zwischen Ceramid und LC3B-II auf die mitochondriale Membranen ist einer DRP1-vermittelten mitochondriale Spaltung nachgeordnet, was zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod führt. Dementsprechend scheint CerS1, also das C18-Ceramid, notwendig und ausreichend für die Induktion der letalen Mitophagie und Tumorsuppression *in vivo* zu sein.

Die Studien zeigten weiter, dass ein LC3B-Konstrukt unterschiedliches Bindungsverhalten zu unterschiedlich langen Ceramiden zeigte. So scheint LC3B-II neben endogenen C18-Ceramiden auch mit C16-Ceramid, C24-Ceramid und 17C-Sphingosinen zu assoziieren. Wohingegen LC3B mit endogenen C18-Ceramiden sowie C16- und C-24-Ceramiden wechselwirken zu scheint. Diese Daten sind konsistent mit der Bindungspräferenz von CERT, dem Ceramid Transport Protein, das mit

mehreren Ceramid-Arten, wie C14- und C20-Ceramiden interagiert, allerdings nicht mit Ceramiden, die eine längere Acylkette tragen.²³³

Diese Aussagen stellen eine mechanistische Verbindung zwischen Ceramid-Signalisierung und der tödlichen Autophagie, einer Schlüsselkomponente des Überlebens, her.²³³

6.2 Protein-Lipid Interaktionen

Lipide funktionieren überwiegend durch ihre Wechselwirkungen mit Proteinen. Tatsächlich sind Protein-Lipid-Wechselwirkungen in allen biologischen Prozessen beteiligt und sie sind von größter Bedeutung in der pharmazeutischen Industrie, da sich ca. 60% der Wirkstoffziele an der Zelloberfläche oder in anderen Zellmembranen befinden. Integrale und periphere Membranproteine machen ein Drittel des vollen Proteoms aus; Jedoch bleibt die Erforschung der Mechanismen, die Lipide zur Regulierung der Proteinfunktion und Struktur verwenden, auf eine kleine Anzahl von Proteinen beschränkt. Diese Wissenslücke ist auf einen Mangel an Methoden zurückzuführen, welche eine systematische Auswertung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen ermöglichen. Man benötigt neue Technologien, ähnlich denen, die es bereits für DNA-Protein- und RNA-Protein-Wechselwirkungen gibt, um die zahlreichen Protein-Lipid-Wechselwirkungen genau zu charakterisieren. Ein globaler Atlas von Protein-Lipid-Wechselwirkungen würde der Biologie und Medizin zugute kommen, um Licht auf die Rolle von Lipide mit bioaktiver Aktivität zu werfen, sowohl durch die Entschlüsselung neuartiger Wirkungsweisen von Lipiden als auch durch ihre Wechselwirkungen mit Proteinen.²³

Mehrere biochemische, biophysikalische und strukturelle Methoden werden traditionell verwendet, um biomolekulare Wechselwirkungen zu studieren. Ein Großteil dieser klassischen Methoden wurde an das Studium von Protein-Lipid-Wechselwirkungen angepasst, wie: Röntgenkristallographie, NMR, isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und Mikroskale Thermophorese (MST). Diese Assays haben in der Regel einen niedrigen Durchsatz, aber durch sie hat man bereits wichtige atomare oder mechanistische Modelle für die verschiedenen Arten von Protein-Lipid-Wechselwirkungen erstellen können, und sie bleiben die Methoden der Wahl für das Studium integraler Membranproteine.

Im Folgenden wird daher die prominenteste und weitverbreiteste Methode erläutert, die SPR. SPR ermöglicht die direkte und schnelle Messung der Lipid-Protein-Assoziation und Dissoziation, ohne dass die Proteine oder Lipide dazu markiert werden müssen. Die Interaktionen werden auf der Oberfläche von *Sensor Chips* untersucht, die mit einer sehr dünnen Schicht aus Gold beschichtet sind, auf die eine künstliche Membran oder Liposom aufgebracht wird. Die Rekrutierung eines wechselwirkenden Proteins zur künstlichen Membran oder zum Liposom verändert den Brechungsindex an der Oberfläche des Chips; Diese Informationen werden aufgezeichnet. SPR-Studien können sowohl quantitative als auch qualitative Daten über molekulare Wechselwirkungen liefern, zum Beispiel Informationen über die Lipidspezifität oder über die Auswirkungen von Mutationen auf Bindungsaffinitäten.²³

6.2.1 Neue *in vitro* Methoden

Biochemische und biophysikalische Assays, basierend auf der Verwendung von künstlichen, Ersatz-Membranen sind beliebt (siehe oben), da sie erlauben, Lipide *in vitro*, also unter definierten Umgebungs- und Versuchsbedingungen zu untersuchen (das heißt, unabhängig von anderen Attributen oder Bestandteilen von zellulären Membranen).

Lipid-Overlay und *Lipid-Pull-Down-Assays* basieren auf demselben Prinzip und beinhalten die Immobilisierung von individuellen Lipiden (oder Lipidkopfgruppen) auf einem festen Träger (z. B.: Nitrozellulosemembranen für *Lipid-Overlay* und magnetische Kügelchen für *Lipid-Pull-Down-Assays*). Die Proteine, die an die immobilisierten Lipide binden, können entweder bei der Immunodetektion (z.B.: mit fluoreszierendem oder chemolumineszierendem Antikörpern) oder massenspektrometrisch charakterisiert werden. Der *Lipid-Overlay-Assay* ist im Handel erhältlich und ist weit verbreitet, um Protein-Lipid Wechselwirkungen *in vitro* zu messen. Aber ein wesentlicher Nachteil beider Ansätze ist, dass die Lipide unter hochkünstlichen Bedingungen getestet werden, zum Beispiel außerhalb einer Membran-Doppelschicht und bei hohen, nicht-physiologischen Konzentrationen. So sind sie anfällig für Artefakte und die gefundenen Interaktionen müssen mit orthogonalen Assays überprüft werden.²³

Bei dem Protein-Array werden die Proteine auf einer festen Phase immobilisiert und die Bindung von fluoreszenzten Liposomen, die ein Trägerlipid (meist Phosphatidylcholin) tragen, an dem Lipid gemessen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass Liposomen eine Membranschicht bilden und folglich die *in vivo* Situation eng imitieren. Allerdings wird dieses Verfahren durch die Tatsache begrenzt, dass die bisherigen Protokolle, zur Produktion, Handhabung und zum Speichern der Liposomen sehr arbeitsintensiv und schwer zu vergrößern sind und somit eine systematische Analyse verschiedener Typen von Membranen ausgeschlossen ist.²³

6.2.2 Neue *in vivo* Methoden

Die jüngsten technischen Fortschritte haben die Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen *in vivo* ermöglicht. Vor kurzem wurde eine Reihe von neuen physiologischen Assays entwickelt, die einige Nachteile der herkömmlichen *in vivo* funktionellen Assays verringern. Ein Beispiel ist die Affinitäts-Aufreinigungs-Lipidomik, die auf die homologe Expression von affinitätsmarkierter Proteine zur systematischen Aufreinigung und Charakterisierung von Protein-Lipid-Komplexen, die *in vivo* zusammengesetzt wurden. Der Hauptvorteil dieser Methode ist, dass endogen exprimierte und native Proteine aus Zellen oder Geweben gewonnen werden, wobei die physiologischen Bedingungen genau gespiegelt werden. Die Protein-Lipid-Komplexe werden während des gesamten Reinigungsprozesses in ihren nativen Zuständen gehalten, sie bleiben funktional und können für *in vitro*-basierte Assays oder strukturelle Analysen zugänglich gemacht werden. Die co-eluierenden Proteine und Lipide werden dann nach massenspektrometrischen und lipidomischen Methoden analysiert. Dieses Protokoll ist nicht auf einen Zelltyp beschränkt und es kann grundsätzlich verwendet werden, um Veränderungen in der komplexen Zusammensetzung zwischen Zelllinien oder Zellstimulationen zu quantifizieren. Der Assay ist leicht skalierbar und wurde bereits auf Hefe-Kinasen und Lipid-Transfer-Proteine angewendet, was neue Mechanismen für den nicht-vesikulären Transport von Phosphatidylserin zwischen Organellen enthüllte. Diese Pilotstudien haben gezeigt, dass die Affinitäts-Aufreinigungs-Lipidomik ein gutes Werkzeug ist, um Lipid-Protein-Interaktionen zu untersuchen; aber vor allem hat sich gezeigt, dass breitere, proteom-weite Studien unternommen werden müssen, um die Protein-Lipid-Wechselwirkungen in höheren Eukaryonten charakterisieren zu können. Insgesamt ist dieser Ansatz jedoch auf die Charakterisierung von relativ stabilen und löslichen Protein-Lipid-Komplexen limitiert.²³

6.2.3 Bisherige Bemühungen zur Bestimmung neuartiger Protein-Lipid-Wechselwirkungen mit funktionalisierten Lipiden

Kleinmolekulare Metaboliten sind zentrale Bestandteile des Lebens, insbesondere dort wo ihre biologischen Funktionen durch Wechselwirkungen mit Proteinen vermittelt und reguliert werden. Diese Metaboliten-Protein-Wechselwirkungen umfassen Liganden-Rezeptor-, Substrat-Enzym- und Klient-Träger-Beziehungen, von denen viele Schlüsselpunkte in biochemischen Netzwerken repräsentieren, die Zellphysiologien und Krankheiten regulieren. Eukaryotische und prokaryotische Zellen beherbergen zahlreiche strukturell unterschiedliche Metaboliten und unter diesen natürlichen Produkten zeigen die Lipide eine herausragende Fähigkeit, mit den Proteinen zu interagieren und sie zu beeinflussen.²³⁴ Sterol-Metaboliten interagieren zum Beispiel mit einem breiten Satz von Enzymen, Trägern und Rezeptoren, um die Zusammensetzung und Struktur von Zellmembranen sowie physiologische Prozesse wie Entzündungen, Stoffwechsel und den Blutdruck zu regulieren.²³⁵⁻²³⁷ Viele Fettsäure abgeleitete Lipide, einschließlich der Phospholipiden, als auch die neutralen Lipide, werden durch diskrete Enzym- und Transportwege reguliert und die Signale werden durch eine Reihe von nuklearen Hormonrezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) übertragen.^{237,238} Lysophospholipide haben zum Beispiel wichtige Rollen bei der Regulierung der Funktion des Immunsystems und des Nervensystems²³⁹ und ihre Rezeptoren sind als Arzneimittelziele für Krankheiten wie Multiple Sklerose entstanden.²⁴⁰ Oxidativ modifizierte Arachidonsäure (AA)-Metaboliten oder Eicosanoide, einschließlich Prostaglandinen und Leukotrienen, dienen als zentrale Vermittler von Schmerzen und Entzündungen, kardiovaskulärer Funktionen und Parturitionen²⁴¹ und inspirieren die Entwicklung von Medikamenten, die auf Proteine zielen, die in der Produktion und Signalisierung von Eicosanoiden involviert sind.²⁴² Zu den zusätzlichen Arachidonoylmetaboliten gehören die Endocannabinoide *N*-Arachidonylethanolamin (Anandamid oder AEA) und 2-Arachidonoylglycerin (2-AG), die endogene Liganden für die Cannabinoid-CB1- und CB2-GPCRs²⁴³ sind, und oxidierte Varianten der Endocannabinoide, wie Prostamide und Prostaglandinester, die eine aufkommende Klasse von entzündlichen Mediatoren darstellen.²⁴⁴ Die etablierten und auftauchenden Funktionen für Lipide in der Säugetierbiologie, zusammen mit der beträchtlichen Anzahl von Arzneimittelzielen, die lipidbindende Proteine sind, zeigen, dass die Charakterisierung der vollständigen Komplementierung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen in Zellen das Potenzial hat, neue Signalisierungsarten aufzudecken, die für pharmakologische Störungen verantwortlich sind.

Zelluläre Prozesse werden durch die konzertierte Aktion zahlreicher Biomoleküle vermittelt, die komplexe Wechselwirkungsnetze bilden. Es wurden bis heute bereits beträchtliche Anstrengungen unternommen, um das zelluläre Interaktom zu erforschen, wobei die Mehrheit der Studien auf die Charakterisierung von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Metaboliten-Interaktionsnetzwerken fokussiert war.^{245,246} Noch zwei Drittel des zellulären Proteoms arbeiten an der Membranoberfläche oder innerhalb einer Membran, die Tausende von verschiedenen Lipidspezies umfasst. Neben der Bedienung als wesentliche Bausteine von Membranen und wasserfreien Energiespeichern nehmen Lipide an einer Vielzahl von Signalwegen teil. Störungen in der Lipidhomöostase führen häufig zu menschlichen Krankheiten, die von neurodegenerativen Erkrankungen bis hin zu metabolischem Syndromen und Krebs reichen.^{21,189} Während diese Erkenntnisse ein kompliziertes Zusammenspiel von Proteinen und Lipiden voraussetzten, wurden immer noch zu wenige Studien durchgeführt, um Protein-Lipid-Wechselwirkungen systematisch zu untersuchen.

Aus diesem Grunde studierte die Gruppe um Cravatt *et al.*²⁴⁷ die globale Interaktionskarte lipidbasierter chemischer Proteom-Sonden in Säugetierzellen. Dabei fokussierten sie ihre Arbeit insbesondere auf die Identifizierung von Protein-Wechselwirkungsprofilen verschiedener Struktur lipide, die eine bevorzugte Kapazität für Arachidonoyl-Lipide offenbaren. Sie konzentrierten sich auf Fettsäure-basierte Sonden mit einem begrenzten Potenzial für eine metabolische Einarbeitung in komplexere Lipide.²⁴⁸⁻²⁵² Sie konnten zeigen, dass ihre Lipidsonden für die Anreicherung und Identifizierung von hunderten von lipidbindenden Proteinen verwendet werden konnten; das der proteom-weite in situ-Engagement-Assays zur Bestimmung der Ziele und Off-Targets von Medikamenten, die Lipid-Biologie beeinflussen; und dass sie ihr Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von kleinmolekularen Liganden für lipidbindende Proteinen nutzen konnten. Weiter konnten sie die breite Ligandenfähigkeit des Lipidinteraktionsproteoms veranschaulichen und dieses Konzept durch die Entwicklung selektiver Liganden für das lipidbindende Protein Nucleobindin-1 (NUCB1), das den Endocannabinoid- und Eicosanoid-stoffwechsel in Zellen stört, anwenden.²⁴⁷

Wie bereits erwähnt, ist Cholesterin ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembranen und dient als Vorläufer für mehrere Klassen von Signalmolekülen. Cholesterin übt seine Wirkungen aus und ist selbst in großem Teil durch spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen reguliert. Die vollständige Komplementierung von sterolbindenden Proteinen, die in Säugetierzellen existieren, bleibt jedoch unbekannt. Aus diesem Grunde verwendete die Gruppe von Cravatt *et al.*²⁵⁰ eine chemoproteomische Strategie, mit anklickbaren, photoreaktiven Sterol-Sonden in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie, um Cholesterin-Protein-Wechselwirkungen direkt in lebenden Zellen zu untersuchen. Sie waren in der Lage über 250 Cholesterin-bindende Proteine, darunter viele etablierte aber auch bisher nicht bekannte Wechselwirkungen mit Rezeptoren, Kanälen und Enzymen, zu identifizieren. Unter den neu identifizierten Wechselwirkungen zeigten u.a. sich Proteine, die Zucker, Glycerolipide und Cholesterol selbst regulieren, sowie diejenigen, die an vesikulärem Transport und Protein-Glycosylierung und -abbau beteiligt sind und auf Schlüsselpunkte in biochemischen Wegen hinweisen, die die Sterolkonzentrationen mit der Kontrolle anderer Metaboliten und Proteinlokalisierung und -modifikation verknüpfen könnten. Mit ihrer Arbeit waren sie in der Lage frühere Studien basierend auf radioaktiven, photovernetzende Sonden zu erweitern, indem sie ein Mittel zur Verfügung stellen, nicht sterinbindende Proteine aus Säugetierzellen zu detektieren und affinitätsanreichernd zu identifizieren. Allerdings besitzt auch diese neu entwickelte Methodik einige Limitierungen, so war der erste Satz an Sonden nicht in der Lage, bestimmte Sterol-Protein-Wechselwirkungen zu detektieren, die durch die Diazirin- und/ oder veresterten Alkin-Modifikationen an der Struktur von Cholesterol beeinträchtigt waren. Weiter könnte die verwendete Esterbindung anfällig für die Spaltung durch endogene Esterasen sein, was die Empfindlichkeit des Proteomprofils verringern könnte. Außerdem ist in den meisten Fällen noch nicht bekannt, wie die Sterol-Sonden an ihre Zielproteine binden. In zukünftigen Studien sollten ebenfalls weitere Zelltypen und -bedingungen (z.B. Zellen, die mit Statinen oder anderen cholesterinsenkenden Reagenzien behandelt wurden) untersucht werden, die zusätzliche Sterol-interagierende Proteine identifizieren könnten.²⁵⁰

Zur Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen in Hefe verwendeten Gallego *et al.* einen umfassenden Satz von Tandem-Affinitäts-gereinigten Proteinen und untersuchte diese auf miniaturisierten Nitrocellulose-Lipid-Arrays. Diese Arbeit führte zu dem neuartigen Konzept, dass Pleckstrin-Homologie-Domänen doppelte Bindungsspezifitäten haben können und als Koinzidenzsensoren für unterschiedliche Lipidklassen dienen können.²⁴⁸ Andere Studien konzentrierten sich auf die Anwendung radioaktiver photoaktivierbarer Lipide, um einzelne Protein-Lipid-Wechselwirkungen in lebenden Zellen zu untersuchen.^{253,254} Dieser Ansatz führte kürzlich zur

Identifizierung einer bevorzugten Wechselwirkung des Membranproteins p24 mit einer einzigen Sphingomyelin-Spezies, wobei das Lipid als Kofaktor bei der Bildung von Mantelprotein I (COPI) Vesikel dient.²⁵⁵ Darüber hinaus wurden Phospholipid-basierte Aktivitätssonden zur Charakterisierung von Lipidbindungsproteinen unter Verwendung synthetischer Analoga von Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositolpolyphosphaten angewendet.^{251,256,257} Abgesehen von einer Photoaffinitätseinheit für die kovalente Markierung von Zielproteinen enthalten diese Sonden eine weitere Einheit, die für die Klick-Chemie genutzt werden kann, um den Nachweis und die Anreicherung der vernetzten Proteine zur nachträglichen Identifizierung durch Massenspektrometrie zu ermöglichen. Ein wesentlicher Nachteil dieser bifunktionellen Phospholipid-Analoga ist jedoch, dass ihre Anwendung auf Zellextrakte beschränkt ist, wodurch eine systematische Analyse von Protein-Lipid-Wechselwirkungen in ihrer nativen Umgebung verhindert wird. Für eine globale Analyse von Protein-Lipid-Wechselwirkungen in lebenden Zellen haben Haberkant *et. al.* nun eine 15-C lange photoaktivierbare und anklickbare Fettsäure (pacFA) genutzt, die durch ihre Bifunktionalität für das *in vivo* Profiling geeignet war.²⁴⁹ In ihren Studien wurden die Zellen mit pacFA als Vorläufer für die Biosynthese von bifunktionellen Lipiden inkubiert und die Proteine, die in direktem Kontakt mit einem bifunktionellen Lipid stehen, wurden weiter durch Bestrahlung der Diazirinegruppe mit UV-Licht vernetzt. Dies führte zu einem hochreaktiven Zwischenprodukt, das im Nanosekundenbereich eine kovalente Bindung an Moleküle in unmittelbarer Nähe bildete. Als nächstes wurde das Prinzip der Klick-Chemie verwendet, um die Alkynegruppe mit einem Reportermolekül zu markieren, was die Visualisierung oder Affinitätsreinigung der vernetzten Produkte ermöglichte. Ein wichtiger Vorteil dieses zweistufigen Verfahrens ist, dass das funktionalisierte Lipid nach seiner Wechselwirkung mit einem Proteinbindungspartner durch UV-Vernetzung markiert wird, so dass das sperrige Reportermolekül die Protein-Lipid-Wechselwirkung nicht stört.²⁴⁹

Eine weitere interessante Studie wurde von Yao *et.al.* unternommen.²⁵⁸ Durch die gleichzeitige Einbringung einer alkinhaltigen Cholinkopfgruppe und einer Diazirin-modifizierten Fettsäure in cholinhaltige Phospholipide, die aus lebenden Säugetierzellen synthetisiert wurden, waren sie in der Lage Protein-Phospholipid-Wechselwirkungen erfolgreich in lebenden Zellen zu untersuchen. Die anschließende In-situ-Profilierung der modifizierten Cho-Phospholipid-vernetzten Proteine, gefolgt von der quantitativen Proteomik, erlaubte die Identifizierung von mehreren hundert mutmaßlichen Phospholipid-interagierenden Proteinen, von denen einige weiter validiert wurden. Im Vergleich zu etablierten Methoden^{247,249-251,253} bot diese neu entwickelte Doppelintegrationsstrategie für die metabolische Synthese bifunktionaler PCs eine deutliche Verbesserung für die globale Kartierung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen in lebenden Säugetierzellen.²⁵⁸

Auch wenn es bereits Fortschritte in der Vergangenheit gegeben hat, müssen in der Zukunft alternative Strategien entwickelt werden, um neue Protein-Lipid-Interaktionen aufzudecken und die Kartierung des Liposoms voranzutreiben.

6.2.4 Sphingolipid-Protein-Wechselwirkungen und deren Limitierung

Wie bereits erwähnt, ist Ceramid ein bioaktives Molekül, das an zahlreichen Zell-Signalwegen beteiligt ist, die mit Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose assoziiert sind. Obwohl in den letzten zehn Jahren erhebliche Kenntnisse über Ceramid-regulierte Wege gefunden wurden, bleiben molekulare Mechanismen der Ceramid-Wirkung schlecht verstanden, vor allem aufgrund der begrenzten Informationen über die Ceramid-bindenden Proteine. In einer Studie der Medizinischen Universität von South Carolina²⁵⁹ wurde eine Affinitätsreinigung mit einem synthetischen Biotin-

konjugierten C6-Ceramidanalogon und LC-MS/MS verwendet, um potentielle Ceramid-interagierende Proteine in D6P2T-Schwannomzellen zu identifizieren. Die Aufreinigung führte zur Identifizierung von 97 einzigartigen Proteinen. Die gefundenen und identifizierten Proteine sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, darunter Apoptose, Zellstress, Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Signalisierung, Transkription, Translation, Protein Biogenese, Metabolismus und Transport.

Der zelluläre Ceramidspiegel kann sich in Reaktion auf verschiedene Reize, einschließlich physiologischer Elemente wie Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen sowie Xenobiotika wie Chemotherapeutika ändern. Ceramid ist ein gemeinsamer intermediärer Metabolit in mehreren Stoffwechselwegen, und seine Konzentration wird durch viele Enzyme gesteuert, die an der de novo-Synthese oder Hydrolyse von Ceramiden beteiligt sind, oder die Umwandlung von Ceramiden zu komplexen Sphingolipiden ermöglichen.²⁶⁰⁻²⁶⁵ Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass eine Zunahme von Ceramid mit dem programmierten Zelltod einhergeht.^{189,266,267} In ähnlicher Weise induzierte die Behandlung mit proapoptischen Mitteln die Akkumulation von Ceramid.²⁶³ Zum Beispiel stimulieren mehrere Antikrebsmittel wie Daunorubicin, Camptothecin, Fludarabin und Etoposid die Ceramidsynthese in Krebszellen.²⁶⁸ Aufgrund seiner Apoptose-induzierenden Effekte in Krebszellen wurde Ceramid als *Tumorsuppressor-Lipid* bezeichnet.²⁶⁹ Daher wurden Ceramide im letzten Jahrzehnt weitgehend als potentielle chemopräventive Moleküle untersucht, und weil sie eng an der Regulation von Krebszellwachstum, Differenzierung, Seneszenz und Zelltod beteiligt sind.^{263,266,270} In vielen Studien zeigten zellpermeable Ceramidanaloga (C2- oder C6-Ceramide) eine Aktivität gegen eine Vielzahl von Krebszelllinien. Darüber hinaus kann die Blockierung der Ceramid-Freigabe durch die Hemmung spezifischer Enzyme den Gehalt an endogenem Ceramid erhöhen, was zu erhöhten zytotoxischen Wirkungen von Chemotherapeutika in verschiedenen Krebszellen führt.²⁶⁶ Die Ceramidbehandlung kann auch das Tumorwachstum *in vivo* einschränken, wie in einem Mausmodell des Brust-Adenokarzinoms gezeigt werden konnte.²⁷⁰ In vielen dieser Studien sind jedoch die direkten Ziele von Ceramid- und *Downstream*-Prozesse noch nicht geklärt. Derzeit ist eine begrenzte Anzahl von Proteinen bekannt, die direkt mit Ceramiden interagieren, einschließlich c-Raf²⁷¹, der Kinase Suppressor von RAS (KSR)²⁷², Cathepsin D^{273,274}, die Proteinkinase C zeta (PKC zeta)²⁷⁵, das Ceramid-Transferprotein CERT²⁷⁶ und der Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 2A (I2PP2A)²⁷⁷. Es ist zwingend erforderlich, alle Ceramid-interagierenden Proteine zu identifizieren, um Ceramid-vermittelte Signalwege vollständig abzugrenzen und Ceramid-basierte Therapeutika in der Krebsbehandlung zu entwerfen.²⁵⁹

Andere Gruppen nutzten radioaktiv markierte Ceramid-Analoga mit einer lichtempfindlichen Gruppe synthetisiert. Diese Verbindung wurde dann in Photo-Affinitäts-Markierungsexperimenten in primär kultivierten zerebellaren Neuronen eingesetzt.²⁷⁸ Aufgrund der hydrophoben Beschaffenheit der Verbindung wurde der Großteil der zellassoziierten Radioaktivität in der Lipidfraktion gewonnen, während nur etwa 0.1% der Radioaktivität zu Proteinen photokuppelten. Um die Markierung der Proteine zu verbessern wurde die zytosolischen Fraktion von schnell wachsenden menschlichen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) isoliert und einer Ceramid-Affinitätschromatographie vor der Photoaffinitätsmarkierung unterworfen. Folgende Elektrophorese-Proteine wurden durch MALDI-Massenspektrometrie in Kombination mit der tryptischen Verdauung identifiziert und erwiesen sich entweder als zytoskeletale oder Stressproteine, die in Zytosol sehr reichlich vorhanden sind und mindestens eine hydrophobe Domäne enthalten. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Sphingolipid-Ceramid ein wichtiger Akteur in anti-proliferativen zellulären Reaktionen ist, einschließlich Apoptose, Zellzyklus-Arrest, Differenzierung und Seneszenz.²⁷⁹ Mehrere extrazelluläre Mittel und Stressreize wie Tumornekrosefaktor (TNF α), ionisierende Strahlung, Wärme und

chemotherapeutische Mittel verursachen eine Ceramidakkumulation durch Regulierung verschiedener Enzyme, die an ihrem Metabolismus beteiligt sind.²⁸⁰ Es wurde festgestellt, dass in der Tat viele biologische Effekte von Zytokinen und Stress-Induktoren an Ceramid-Akkumulation gekoppelt sind und von diesem Lipid nachgeahmt werden können. So kann die Zugabe von exogenem Ceramid zu vielen verschiedenen Krebszellen eine Apoptose induzieren, die oft von einem Zellzyklus-Arrest begleitet wird. Unter den Wirkungen von TNF α und anderen durch Ceramid reproduzierten Zytokinen sind die Aktivierung von Caspasen²⁸¹, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien²⁸² und die Inaktivierung der Proteinkinase C α .²⁸³ In anderen Zelltypen wie Keratinozyten oder zerebellären Purkinje-Zellen kann Ceramid biochemische Programme der Zelldifferenzierung^{284,285} induzieren. Trotz der großen Anzahl von Berichten über zelluläre Reaktionen auf erhöhte Ceramidspiegel ist der Nachweis für direkte Ziele von Ceramid recht begrenzt. Die mutmaßlichen Zielproteine, von denen berichtet wurde, dass sie auf Ceramid reagieren und einige ihrer Wirkungen vermitteln, wurden oben bereits erwähnt. Die Gruppe von Schütze²⁸⁶ erzeugte eine Ceramid-Affinitätsmatrix²⁸⁷, die ihnen half, Cathepsin D als Ceramid-bindendes Protein erfolgreich zu detektieren. In der Arbeit von Heinrich *et al.*²⁸⁶ wurde die Identifizierung von eluierten und elektrophoretisch getrennten Proteinen durch Immunoblot-Screenings unter Verwendung ausgewählter Antikörper gegen mutmaßliche Kandidaten-Targets durchgeführt.²⁷⁸

Auch Sphingolipide sind wesentliche Strukturkomponenten zellulärer Membranen und sind entscheidende Regulatoren zellulärer Prozesse. Während die derzeitigen Hochdurchsatz-Ansätze eine systematische Charakterisierung von Wechselwirkungen löslicher Proteine mit ihren lipidbindenden Partnern ermöglichen, ist die Photoaktivierung die einzige Technik, die für die proteomweite Verfolgung von integralen Membranproteinen mit ihrer direkten Lipidumgebung ermöglicht. Die Gruppe um C. Schulz *et. al* berichtete beispielsweise über die Synthese eines photoaktivierbaren und anklickbaren Analogons von Sphingosin (pacSph). Sie greifen dabei auf einen Ansatz zurück, der bereits von anderen Gruppen etabliert wurde. Man nutzt photoaktivierbare und anklickbare Lipide zur *in vivo* Identifizierung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen.^{247,249,250,288} Durch ihre Studien konnten sie über 180 neuartige Sphingolipid-bindende Proteine identifizieren, von denen eine gewisse Zahl validiert werden konnte, um den einzigartigen Wert dieser Technik als Entdeckungsinstrument zu demonstrieren. Allerdings stießen auch sie auf eine Limitierung ihres Verfahrens. Die beobachtete schnelle Umwandlung von extrazellulär bereitgestellten Sphingosin-Analoga und deren Einarbeitung in andere Lipidklassen beschränkt die Anwendungen der Verbindung auf S1PL-Knock-out-Zelllinien. Allerdings könnte die dargestellte Technologie dazu beitragen, putative therapeutische Wirkstoffziele in Sphingolipid-bedingten Krankheiten zu identifizieren.²⁸⁹

In der Tat, einer der großen "Hohlräume" in unserem Wissen über die Funktion der bioaktiven Sphingolipide leitet sich aus dem Mangel des Verständnisses ab, wie sie funktionieren und mit welchen Proteinen sie interagieren. Dies ist vor allem auf fehlende Werkzeuge zurückzuführen, die eine systematische Charakterisierung von Protein-Sphingolipid-Wechselwirkungen ermöglichen. Letzteres gilt insbesondere für Wechselwirkungen von membranübergreifenden Proteinen in ihrer nativen Umgebung. Im Jahr 2010 wurde der erste Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptormodulator, Fingolimod (FTY720) als Therapeutikum für Multiple Sklerose zugelassen und zeigt die Bedeutung von Protein-Sphingolipid-Komplexen als potentielle therapeutische Ziele.²⁹⁰

7 Zielsetzung der Arbeit

Die Familienmitglieder der Sphingolipidfamilie sind bioaktive Moleküle, die wichtige Rollen bei der Signaltransduktion spielen und als Botenstoffe in einer Vielzahl von Prozessen, einschließlich der Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose, Seneszenz, Autophagie, Angiogenese und vielen mehr, interagieren. Aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung hat die genaue Beschreibung des vollständigen Sphingolipid-Profiles, das Sphingolipidom, innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes viel Aufmerksamkeit in den letzten Jahren auf sich gezogen.²⁹¹ Insbesondere Ceramid und seine zuerst als unwichtig erachtete Vorstufe Dihydroceramid treten mehr und mehr in den Vordergrund der aktuellen Forschung. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten haben sie in einigen Untersuchungen unterschiedliche zelluläre Funktionen gezeigt. So scheint Dihydroceramid in den Anfängen der Autophagie involviert zu sein, wohingegen ein erhöhter Ceramid-Gehalt mit Prozessen der Apoptose in Verbindung gebracht wird. Neben diesen Eigenschaften und Funktionen interagieren diese Spezies auch über ihre Lipide mit weiteren Proteinen. In der Literatur wurden bereits mehrere Bindungspartner des Ceramid Proteins identifiziert. Dazu gehören das Ceramid-Transportprotein (CERT), der Ceramid-Kinase-Suppressor-Ras (KSR), der Inhibitor der Protein-Phosphatase 2A (I2PP2A) und der Autophagie Marker LC3B.^{233,272,276,277} Zusätzlich wurden im Jahre 2012 durch Proteom-Studien mit einem synthetischen Biotin konjugierten C⁶-Ceramid-Analogs weitere mögliche Ceramid-Proteinpartner enthüllt.²⁵⁹ Allerdings kann die Verwendung von Ceramid-Analoga in den meisten Fällen, die sperrige Markierungen wie Biotin tragen, ihre biologischen Eigenschaften beeinflussen und die Bindung mit potentiellen Partnern beeinflussen. Darüber hinaus kann die Substitution der langen Acylkette durch kürzere Analoga die Identifizierung spezifischer längenabhängiger Effekte der verschiedenen Ceramidarten (C16-Cer, C18-Cer etc.) ausschließen.

Es besteht somit nach wie vor ein eindeutiger Bedarf an der Entwicklung neuer Ansätze, um die Identifizierung neuer Ceramid-bindender Proteine voran zu treiben. Zudem deuten die Unterschiede in der Aktivität des Ceramids und seines gesättigten Vorläufers Dihydroceramid daraufhin, dass Studien mit diesen Lipiden dazu beitragen könnten, neue und eventuell auch verschiedene Wechselwirkungspartner in der Zelle zu ermitteln.

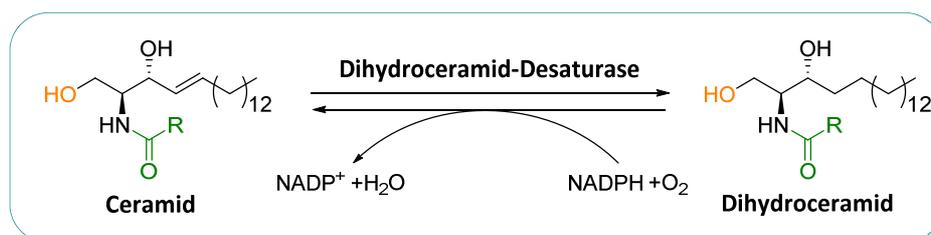


Abbildung 59: Ceramid und Dihydroceramid.

Jüngsten Fortschritten in der Forschung sowie die Entwicklung von bioorthogonalen Reaktionen, insbesondere die Azid-Alkin-Cycloaddition (Klick-Chemie), liefern effektive Methoden, um Ceramide selektiv innerhalb der komplexen Umgebung einer lebenden Zelle und Zellextrakten zu markieren.

Das finale Ziel dieser Studie ist die Identifizierung neuer Ceramid-Proteinpartner durch den Einsatz zweier komplementärer Ansätze: einem Protein *Mikroarray* und einem klassischen *Pull-down*. Neue Ceramid bindende Proteine könnten zu einem besseren Verständnis für die molekularen Grundlagen während der Apoptose führen und der Forschung so weitere Einblicke in die Pathogenese menschlicher Krankheiten liefern. Dies könnte wiederum zu neue Strategien und therapeutischen Behandlungen von Krebs und anderen proliferativen Erkrankungen führen.

8 Ergebnisse und Diskussion

Ceramide gehören zu der Familie der Sphingolipide, die in der Regulation verschiedener zellulärer Antworten auf exogene Stimuli beteiligt sind. Die Wirkung von Ceramiden und ihre Regulierung erregen immer mehr Aufmerksamkeit durch ihre wachsende Rolle als intrazelluläres Effektor-Molekül in der Apoptose. Bereits frühere Studien stützen die Ansicht, dass Ceramide in einer oder mehreren Stufen der Apoptose eine wichtige Rolle spielen.^{233,272,276,277} Wie bereits erwähnt, ist das Ziel dieser Studie die Identifizierung neuer Ceramid-Proteinpartner durch den Einsatz zweier komplementärer Ansätze: einem klassischen *Pull-down* und einem Protein *Mikroarray*.

8.1 Synthese von Azido-Ceramid und Azido-Dihydroceramid

Azido-markierte Sphingolipide enthalten ein ω -terminales Azid, welches für die chemoselektive Konjugation an Alkin-modifizierte Reporter genutzt werden kann, um eine Detektion und Anreicherung der als Sonde-interagierenden Probe an die Proteine zu ermöglichen. Zudem sollte die geringe Größe des Azids die strukturellen Eigenschaften des Ceramids nur minimal beeinflussen. Aus diesem Grunde stellen Azido-markierte Ceramide und dessen Derivate (ω N₃Cer) interessante Kandidaten dar, um unbekannte Ceramid- und Dihydroceramid-Interaktionspartner aufzudecken. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden Ceramide durch die Familie der Ceramid-Synthasen (CerS) hergestellt. Derzeit gibt es sechs verschiedene CerS, die sich in ihrer Selektivität für die unterschiedlichen Acyl-CoAs unterscheiden und somit Ceramide mit unterschiedlichen Acylkettenlängen erzeugen.²⁹² Während CerS2, CerS3 und CerS4 bei der Herstellung von langen und sehr langen Ceramidketten (C20-C26-Cer) beteiligt sind, werden kurzkettige Ceramide durch CerS6 (C14-C16-Cer), CerS5 (C16-Cer) und CerS1 (C18-Cer) erzeugt, welche vor allem mit der Induktion der Apoptose assoziiert werden.²⁹³ Um nun eine Charakterisierung von C16-(Dihydro-) Ceramid interagierender Proteine vorzunehmen, wurden diese ω N₃-Ceramid Derivate synthetisiert. Dabei wurde auf den Syntheseweg von Garrido *et al.* zurückgegriffen.²⁹¹

Der kommerziell erhältliche Oxazolidinester wurde in trockenem THF gelöst und unter Rühren auf 0°C gekühlt. Danach wurde eine Lithiumborhydrid-Lösung in THF langsam hinzugegeben und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Um Rückstände des Lithiumborhydrids abzureagieren wurde die Lösung erneut auf 0°C herunter gekühlt und eine gesättigte Lösung von Ammoniumchlorid tropfenweise zugegeben. Das *N*-Boc-*L*-Serinol (40) wurde in CH₂Cl₂ gelöst und mit DMP umgesetzt, um das Garners Aldehyd (41) zu erzeugen. Dieses Aldehyd diente als Startpunkt zur Synthese beider Azid-Analoga (Abbildung 60, Abbildung 61).

Für die Synthese des Azido-Dihydroceramids (ω N₃C16DHCer, 47) wurden *n*-BuLi und Undec-10yn-1-ol zusammen umgesetzt, bevor das Garners Aldehyd (41) zusammen mit DMPU tropfenweise zugegeben wurden. Das Quenchen der Reaktion erfolgte im Anschluss mit einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung. Für die Hydrierung des Alkins wurde dieses mit einem Rhodium-Katalysator umgesetzt. In einem weiteren Schritt wurde es mit Tosyl geschützt und die Azido-Gruppe mittel Natriumazid angefügt. Die Spaltung der Carboxylatschutzgruppe erfolgte durch Zugabe von Acetylchlorid. Durch Zugabe von Palmitoylchlorid wurde im finalen Schritt Azido-Dihydroceramid (ω N₃C16DHCer, 47) mit einer Ausbeute von 60 % erhalten (Abbildung 60).

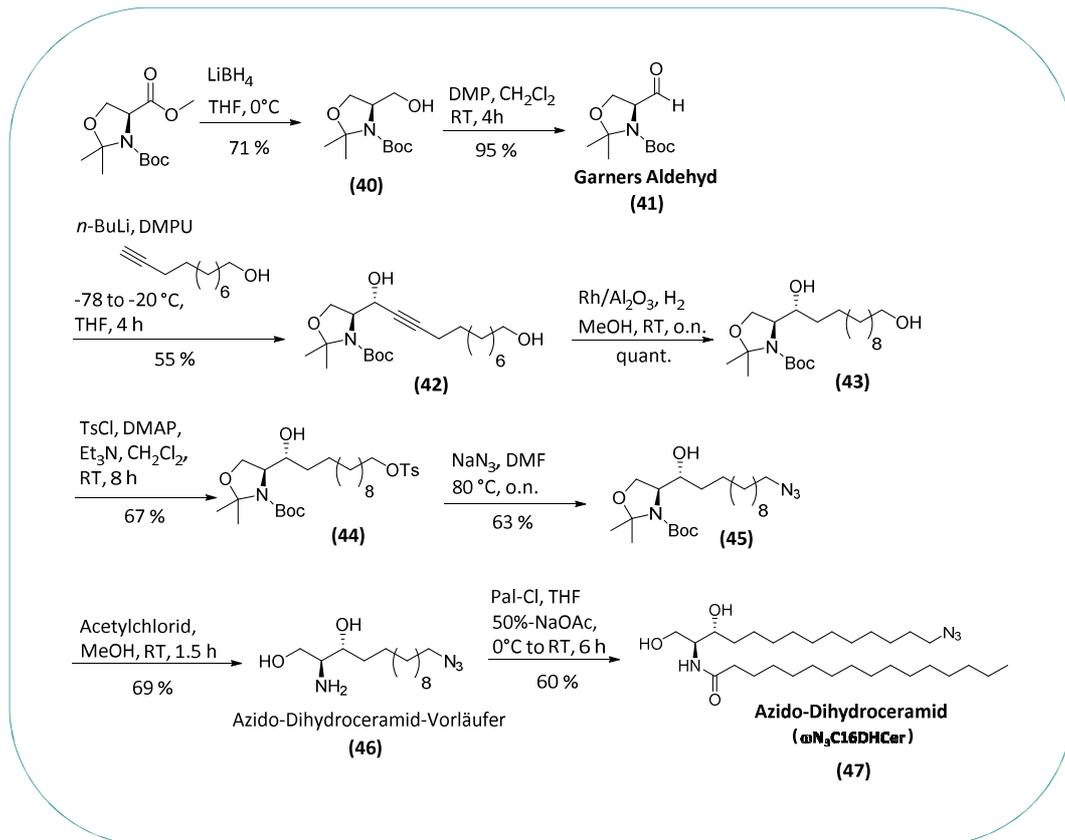


Abbildung 60: Synthese des Azido-Dihydroceramids (ω N₃C16DHCer) nach Garrido.²⁹¹

Die Synthese des nicht palmitoylierten Azido-Ceramid-Vorläufers erfolgte durch Jose Luis Abad am IQAC in Barcelona. Für die finale Palmitoylierung wurde der Vorläufer mit Palmitoylchlorid in einer 50 %-igen Natriumacetat-Lösung umgesetzt, um das Azido-Ceramid (ω N₃C16Cer, **48**) mit einer Ausbeute von 62 % zu erhalten (Abbildung 61).

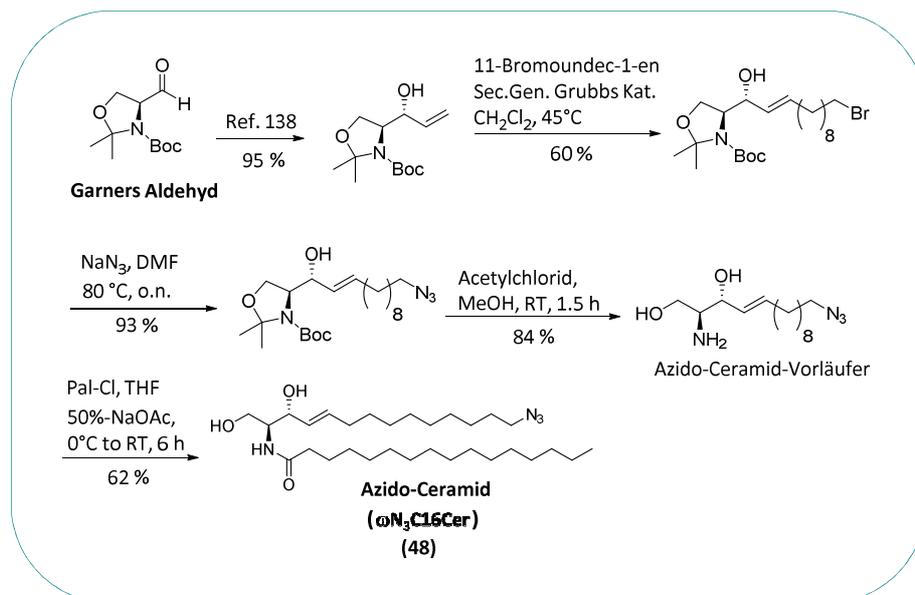


Abbildung 61: Synthese des Azido-Ceramids (ω N₃C16Cer) nach Garrido.^{291,294}

Mit diesen zwei Azido-Proben (ω N₃C16DHCer (**47**) und ω N₃C16Cer (**48**)) in Händen sollten im Weiteren die Interaktionsstudien durchgeführt werden.

8.2 Pull-down und Proteomik mit Azido-Ceramid Derivaten

Um molekulare Interaktionspartner der C16-Ceramidspezies zu identifizieren, wurden zunächst die ω N₃C16-Ceramid Derivate zusammen mit einer Massenspektrometrie basierten Methode für die proteomweite Identifizierung von interagierenden Proteinen verwendet. Zu diesem Zweck wurde das jeweilige ω N₃C16Cer (ω N₃C16DHCer (47) und ω N₃C16Cer (48), Abbildung 62) auf Dibenzocyclooktin (DBCO)-Agarosekügelchen über Cu (I)-freie Alkin-Azid-Klick-Chemie (SPAAC) immobilisiert. Zusätzlich wurde ein Palmitinsäurederivat (50) (Abbildung 62) als Negativkontrolle verwendet, um Proteine auszuschließen, die über nicht-spezifische hydrophobe Wechselwirkungen an die Ceramidspezies binden können. Zur Identifizierung der (Dihydro-) Ceramid-interagierenden Proteinen wurden Zelllysate aus neuronalen Maus-Zellen (Neuro-2a, ATCC® CCL-131™) mit der modifizierten Agarose inkubiert, um mögliche Interaktionspartner aus N2a-Zelllysaten zu isolieren und nach einem tryptischen Verdau zu identifizieren (Abschnitt 10.4.14 und 10.4.17).

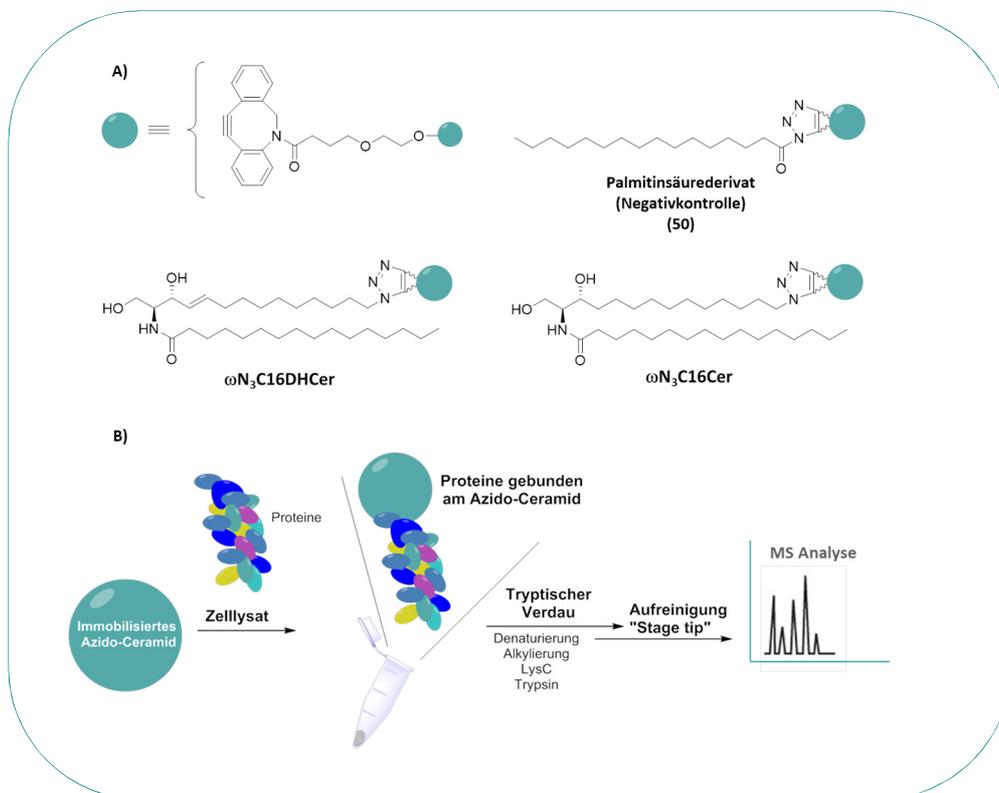


Abbildung 62: A) Strukturen der Pull-down Proben: Die hydrophobe Negativkontrolle, die Azido-Ceramid Probe und die Azido-Dihydroceramid-Probe immobilisiert auf DBCO-Agarose Kügelchen. B) Schematische Darstellung des Pull-down Ansatzes zur Untersuchung möglicher Ceramid-/ Dihydroceramid-Interaktionspartner am Beispiel des Azido-Ceramids.

Nach der erfolgreichen Affinitätschromatographie konnten 214 Proteine (Anhang, Tabelle 9) als potentielle Interaktionspartner für die Ceramid-Derivate identifiziert werden.

Im direkten Vergleich der potentiellen Ceramidspezies bindenden Proteine ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ceramid bzw. Dihydroceramid finden. Nichts desto trotz wurden die für das Ceramid gefundenen Zielproteine einer detaillierten Analyse unterzogen. Bereits bei der ersten Betrachtung der Interaktionspartner fiel auf, dass eine Vielzahl dieser Proteine funktionell mit dem Sphingolipidstoffwechsel in Verbindung stehen. Dazu gehören die Säureceramidase (ASAH1), die Ceramidsynthasen (CERS2, CERS4), die Sphingomyelinphospho-

diesterasen (SMPD3, SMPD4) sowie bekannte Interaktionspartner wie beispielsweise der Apoptoseregler Bax und die Proteinphosphatase PP2A.

Die Zielproteine wurden weiter in Bezug auf ihre biologischen Funktionen unter Verwendung des DAVID-Analysewerkzeuges kategorisiert.²⁹⁵ Dabei zeigte sich eine Anreicherung der Proteine in Bereichen des Proteintransports, in Oxidations-Reduktionsprozessen, in der Regulation der Apoptose, der Mitochondrien-Organisation, der RNA-Verarbeitung, der DNA-Translation oder deren Beteiligung am Sphingolipid-Metabolismus (Abbildung 63A). Mit Hilfe der automatisierten Kyoto-Enzyklopädie von Genen und Genomen, dem sogenannten KEGG-Signalweg²⁹⁶ und dem bereits erwähnten DAVID-Analysewerkzeuges konnte zusätzlich eine Auflistung der Signalwege der gefundenen Proteine vorgenommen werden.

Zu diesen biologischen Signalwegen gehören der zuvor erwähnte Sphingolipidstoffwechsel, Signalwege der Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit, die oxidative Phosphorylierung, das Spliceosom, *gap und tight junctions*, der Fettsäuremetabolismus und der Insulin-Signalweg (Abbildung 63B). Zusätzlich konnten die Interaktionspartner durch die OMIM-Datenbank (Online Mendelian Inheritance in Man) mit zahlreichen Krankheiten, insbesondere Stoffwechselstörungen, Krebs und neurologischen Erkrankungen verknüpft werden (Abbildung 63C).

Ceramid kann in mehreren Kompartimenten generiert und metabolisiert werden. Die Existenz zahlreicher Ceramidsynthasen, Ceramidasen und Sphingomyelinasen, die eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, deuten darauf hin, dass das erzeugte Ceramid wahrscheinlich in jedem subzellulären Kompartiment unterschiedliche Funktionen aufweist.²⁹⁷ Daher kann die Kenntnis der subzellulären Verteilung der Sonden-Zielproteine von großem Wert sein. Die Auswertung der subzellulären Verteilung der Proteine zeigte, dass die Proteine über alle subzellulären Kompartimente mit einer bemerkenswerten Anreicherung im Zellkern, dem Cytoplasma und den Mitochondrien gefunden werden können (Abbildung 63D).

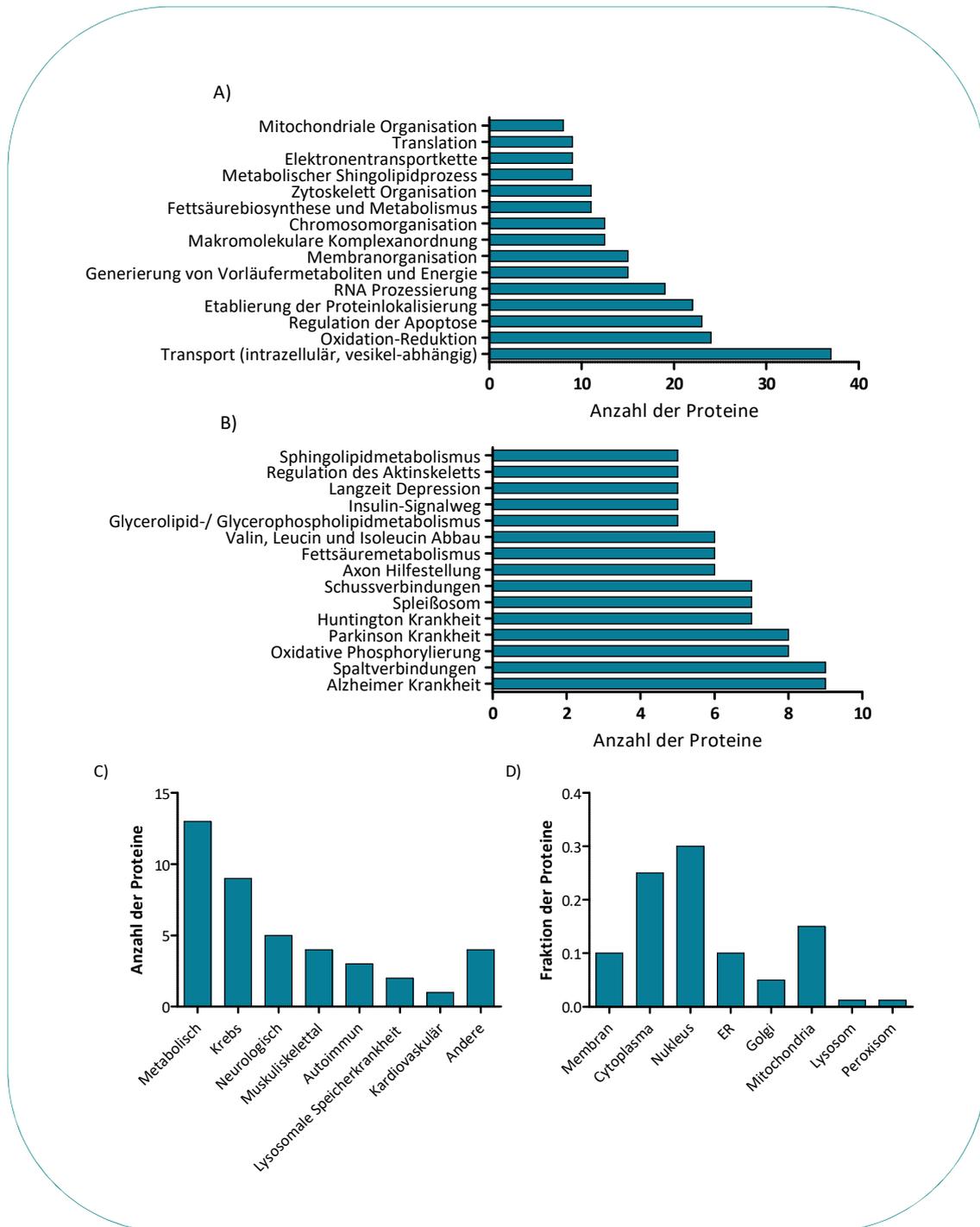


Abbildung 63: Automatisierte Genontologie-, Signalweganalyse (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), und ihre Beziehung zu humanen Krankheiten (OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man) wurden weiter mit dem Analysewerkzeug DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) untersucht. Die subzelluläre Verteilung wurde auf Uniprot basierenden Annahmen vorgenommen. A) Top 15 biologische Funktionen, B) Top 15 KEGG-Signalweg, C) Assoziation der Proteine mit humanen Krankheiten basierend auf der OMIM-Datenbank, D) Subzelluläre Lokalisation.

8.3 Der Protein Mikroarray (ProtoArray®)

Als nächstes wurde das Bindeverhalten der zwei ω_3 C16Ceramidspesies unter Verwendung eines Protein-Mikroarrays untersucht, welcher über 9000 humane Proteine enthält. Der ProtoArray® ist ein Microarray auf dem menschliche Proteine in hoher Dichte immobilisiert wurden. Er besteht aus insgesamt 48 Untereinheiten, die wieder jeweils aus 22 x 22 einzelnen Punkten aufgebaut sind (Abbildung 64).

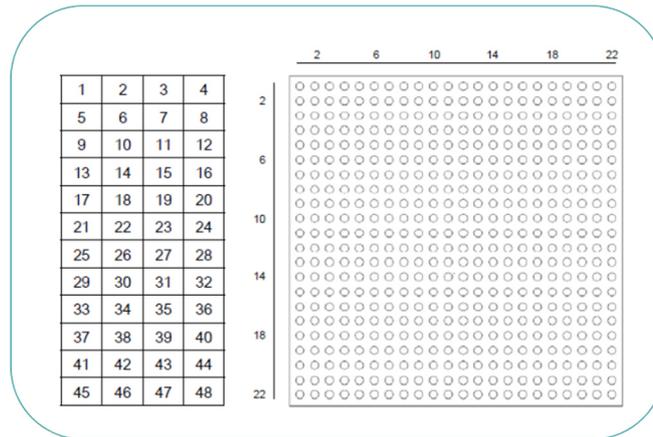


Abbildung 64: Aufbau des Mikroarrays (ProtoArrays®). Links: Darstellung der 48 Untereinheiten. Rechts: Aufbau einer Untereinheit aus 22 x 22 einzelnen Punkten.

Die Technologie dieses Mikroarrays basiert dabei auf der von Hefeprotein Mikroarrays, die im Jahr 2001 von der Gruppe um Zhu entwickelt wurden, um molekulare Wechselwirkungen von Interaktionspartnern zu erkennen. Dazu wird jeder offene Leserahmen (ORF) des Menschen als *N*-terminales GST-Fusionsprotein unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems exprimiert, aus den Insektenzellen isoliert und in doppelter Ausfertigung auf einem Nitrozellulose beschichteten Glasobjektträger immobilisiert. Dabei bleiben die Faltung der Proteine sowie posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung erhalten, um den Nachweis der Protein-Wechselwirkungen auf funktionaler Ebene zu ermöglichen. Unter Verwendung eines markierten Proteins oder eines kleinen Moleküls sowie mit Hilfe eines geeigneten Detektionssystems können diese gegen tausende immobilisierte Proteine innerhalb eines Tages getestet werden, um Protein-Wechselwirkungen zu analysieren.

8.3.1 Immobilisierung auf dem Protein Mikroarray („Klick-Chemie“)

Bevor mit der eigentlichen Immobilisierung der Azido-Ceramid Proben (Abbildung 65) auf dem Mikroarray begonnen werden konnte, musste zusätzlich das Detektionssystem gewählt und durch Testreaktionen für die Übertragung auf das Mikroarray-System überprüft werden.

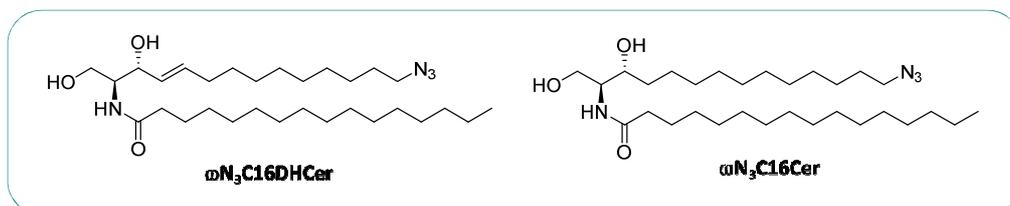


Abbildung 65: Azido-Ceramid ($\omega\text{N}_3\text{C16Cer}$) und Azido-Dihydroceramid ($\omega\text{N}_3\text{C16DHCer}$).

Als Detektionssystem wurde das fluoreszente, zyklische Alkin DIFO-545 (Dibenzyklooctin-PEG4-Fluor-545, Abbildung 66) gewählt, da es ebenfalls eine Cu (I)-freie Alkin-Azid-Klick-Chemie (SPAAC) direkt auf dem Mikroarray ermöglicht.²⁹⁸

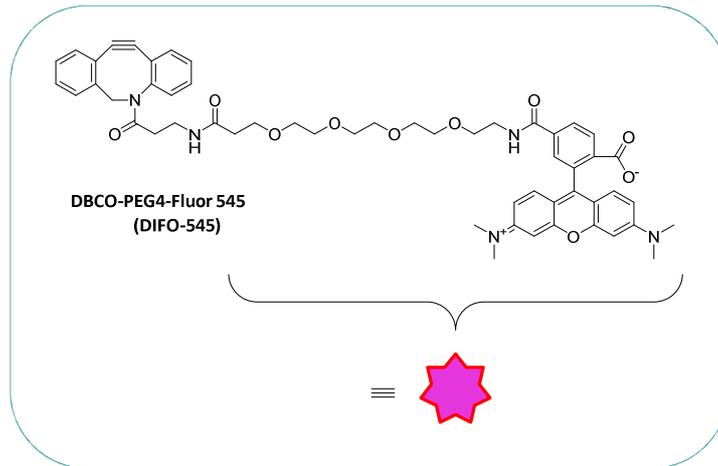


Abbildung 66: Struktur von DIFO-545 (DBCO-PEG4-Fluor-545).

Um eine erfolgreiche Cycloaddition auf dem Mikroarray unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können, wurden zuerst verschiedene Puffersysteme, Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen ausgetestet. Die besten Ergebnisse konnten unter Einsatz eines PBS-Puffers mit einem pH-Wert von 7.4 unter dem Zusatz von 0.1 % DMSO und einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C erreicht werden. Diese Testreaktionen (Abbildung 67) wurden parallel mit beiden Azido-Ceramiden (Abbildung 65) durchgeführt und mittels Massenspektrometrie ausgewertet.

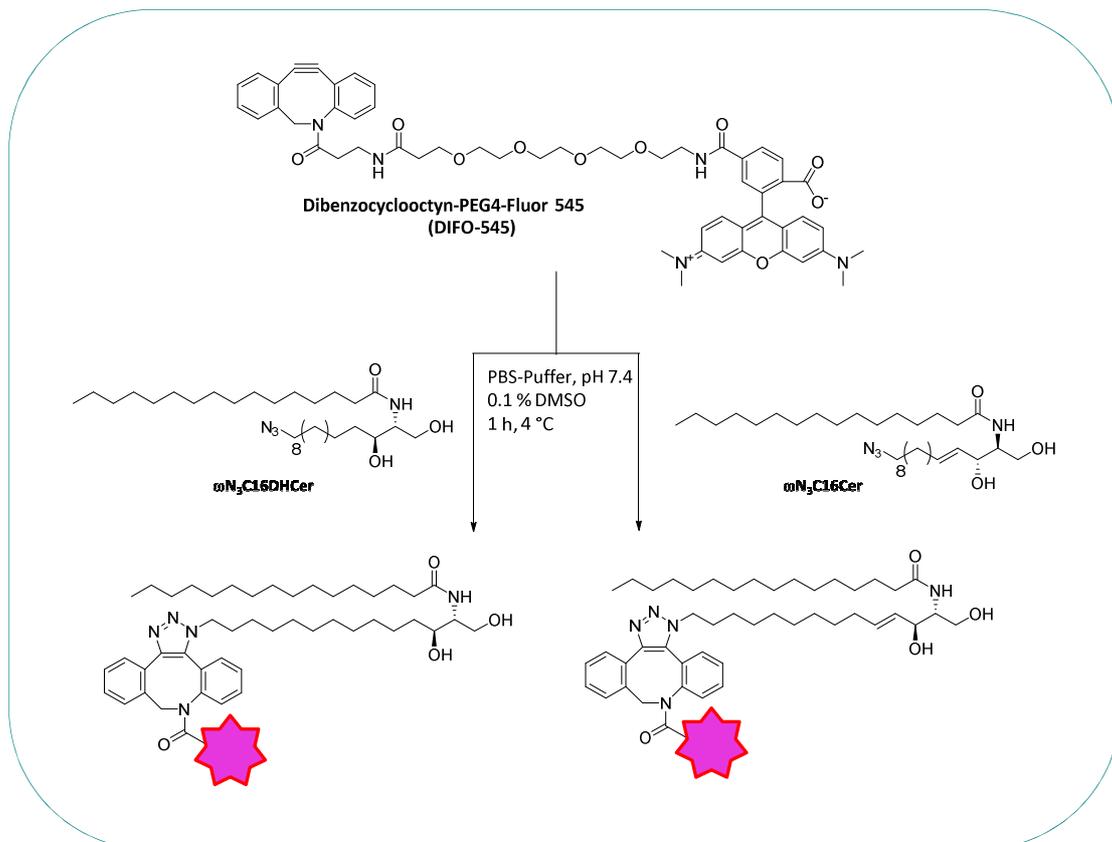


Abbildung 67: Testreaktion der Kupfer-freien Klick-Reaktion.

Nach der erfolgreichen Klick-Reaktion in Lösung sollten die Azido-Derivate des Ceramides auf dem Array immobilisiert werden. Dazu wurde der Mikroarray mit dem jeweiligen ω N₃C16Cer-Derivat inkubiert und im Anschluss gewaschen. Um die kupferfreie Markierung der gebundenen

Ceramidspezies zu ermöglichen, wurden diese mit dem Fluorophor behandelt und erneut gewaschen (Abbildung 68). Durch die finalen Waschschriffe mit verschiedenen Puffern (Abschnitt 10.4.19) sollten unspezifische Wechselwirkungen minimiert werden.

Die Ceramid-bindenden Proteine wurden weiter unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroarray-Scanners (Typhoon®) sichtbar gemacht.

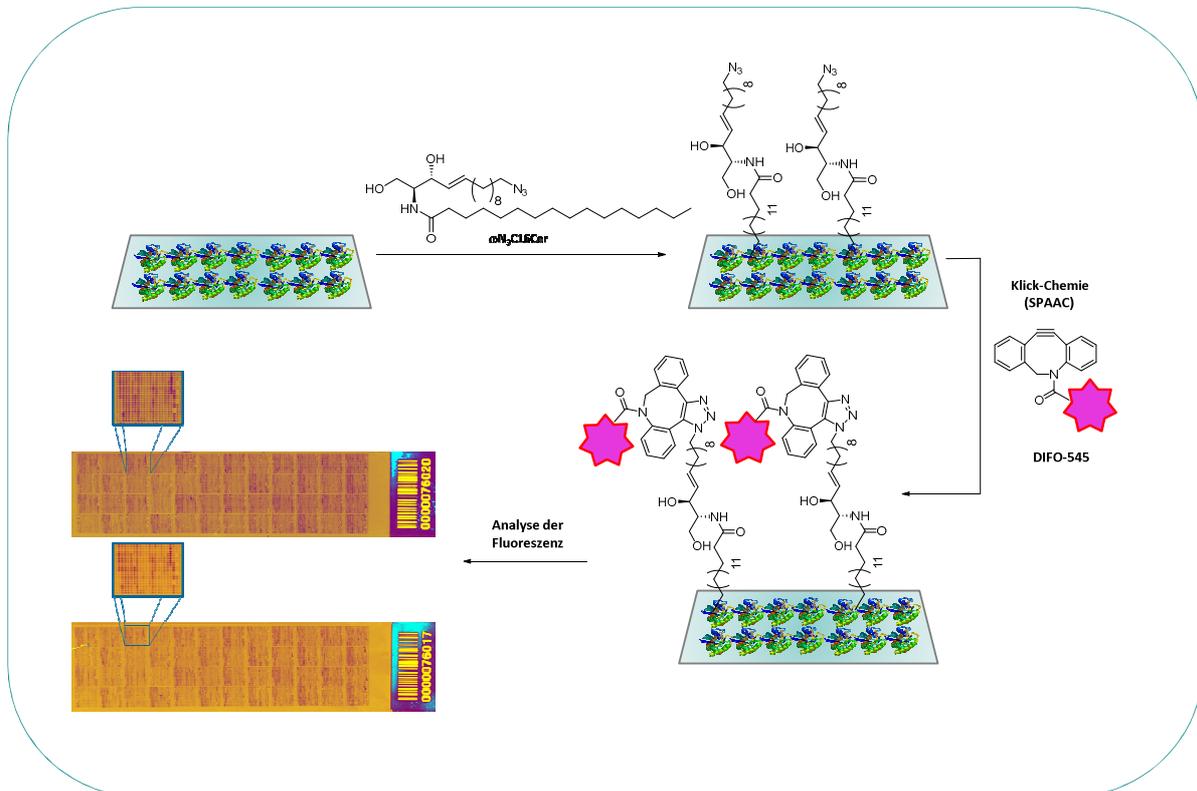


Abbildung 68: Schematische Darstellung der Konfiguration des Mikroarrays am Beispiel des Azido-Ceramids. Scann der Mikroarrays mit dem Typhoon®-Mikroarray Scanner; Absorption: 545nm und Emission: 567nm. Oben: Azido-Ceramid. Unten: Azido-Dihydroceramid.

Die Daten wurden gegenüber dem Hintergrund normalisiert (Image Quant, GE Healthcare) und Signale, die mindestens das Doppelte des Hintergrundsignals betragen, wurden als potenzielle Kandidaten betrachtet. Zwei zusätzliche Kriterien wurden verwendet, um eine signifikante Wechselwirkung zwischen einem Protein und Ceramid zu definieren: Ein Z-Score größer als 3.0 (Z-Score wurde berechnet, indem die Gesamt-Durchschnittsintensität von den Rohintensitätsdaten für jeden Punkt subtrahiert wurde und das Ergebnis durch die SD der gemessenen Intensitäten dividiert wurde) und ein replizierter Spot CV von weniger als 50%, wobei CV der Variationskoeffizient für den Assay aus doppelten Spots ist, bestimmt durch das Dividieren der SD der Spot-Signale durch ihre mittlere Intensität.

Wie man bereits auf den Scans der beiden Mikroarrays erkennen kann (Abbildung 68, Anhang Abbildung 76), zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Bindungspartnern für die Ceramid bzw. Dihydroceramid Verbindungen. Der erste optische Eindruck konnte weiter durch die Analyse der Arrays bestätigt werden. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ceramid- und Dihydroceramid interagierenden Proteinen erkennen. Insgesamt lieferte der Mikroarray eine Liste von 127 Proteinen (Anhang Tabelle 10), einschließlich bekannter Ceramid-interagierender

Proteine, wie Lass2 und Lass4 (Ceramidsynthase 2 und 4), der 1-O-Acylceramidsynthase (PLA2G15) und dem Autophagie-Marker LC3.

Wie bereits erwähnt, konnten in keinem der zwei Analyseansätze (Proteom-Analyse, Mikroarray) signifikante Unterschiede zwischen den zwei Ceramid-Spezies gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie zur Untersuchung des Bindungsverhältnisses von Ceramid-Analoga zu den pro- und anti-apoptischen Proteinen Bax und Bcl-xL gefunden. Auch hier zeigte die C-4/C-5 trans-Doppelbindung kaum Einflüsse auf die Interaktion mit Bindungspartnern.¹⁹⁵

Aus diesem Grunde wurden im Weiteren Studien nur potenzielle Ceramide-Protein Interaktionen validiert.

8.4 Vergleich der Topkandidaten beider Methoden

Die Ergebnisse, die durch die beiden Methoden erhalten wurden, wurden letztendlich verglichen und in eine einzige Liste integriert, die die Proteine enthielt, die mit beiden Ansätzen nachgewiesen werden konnten, was eine endgültige Trefferliste von 24 Topkandidaten ergab (Tabelle 7). Für eine weitere Eingrenzung wurden bereits bekannte Interaktionspartner, wie Sphingolipid verwandte Enzyme oder bekannte Ceramid-Transportproteine wie CERT und verschiedenste CERS entfernt.

Tabelle 7: Überblick der 24 Topkandidaten.

Protein	Name
Acp1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase
Aifm2	Apoptosis-inducing factor 2
Aldh3b1	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1
APP	Amyloid beta A4 protein; N-APP
Bik	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing-Protein 5
Bud31	Protein Bud31 homolog
Cdk5	Cyclin-dependent-like kinase 5
Coq9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial
Ergic1	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1
Fads2	Fatty acid desaturase 2
Gpx4	Glutathione peroxidase; Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
Lgals1	Galectin-1
Lgals3	Galectin-3
Lyplal1	Lysophospholipase-like protein 1
Mtor	Serine/threonine-protein kinase mTOR
Mycbp	C-Myc-binding-Protein
Oxa1L	Mitochondria inner membrane protein OXA1L
Pdxk	Pyridoxal kinase
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Ptges2	Prostaglandin E synthase 2; Prostaglandin E synthase 2 truncated form
Sar1b	GTP-binding-Protein SAR1b
Ube3c	Ubiquitin-protein ligase E3C
Ubl5	Ubiquitin-like protein 5

Diese Liste beinhaltet wichtige Apoptose-verwandte Proteine, wie den Apoptose-induzierenden Faktor Aifm2, den Bcl2-interagierenden Killer (Bik) und das Baculovirale IAP-Repeat enthaltende Protein 5 (Birc5), welches auch als Survivin bekannt ist. Eine weitere relevante Klasse von Proteinen ist an metabolischen Prozessen beteiligt, wie die Proteinphosphatase Acp1, die Aldehyd-dehydrogenase Aldh3b1, das Ubichinonbiosyntheseprotein COQ9, die Ubiquitinligase E3C, die Proteinthioesterase Ppt1 und das eng verwandte Lyplal1. Die Liste schließt aber auch Proteine ein, die an der mRNA-Verarbeitung beteiligt sind, wie das Spliceosom-assoziierte Protein Bud31 und Ubl5.²⁹⁹ Aber auch Proteine, die in Transportprozessen und in der Proteinlokalisierung involviert sind, wie Ergic1, Sar1b und Oxa1l. Andere interessante Proteinkandidaten sind Galectin-1 (Gal1) und Galectin-3 (Gal3), die häufig mit Krebs assoziiert werden,³⁰⁰ die Nährstoffsensorkinase mTOR und die mit der Alzheimerkrankheit-verwandten Proteine APP und Cdk5.

8.5 Validierung der Interaktionspartner

Im nächsten Schritt wurden repräsentative Ceramid-Protein-Wechselwirkungen dieser finalen Liste validiert. Dazu wurden elf Bindungspartner ausgewählt, darunter waren sowohl bekannte (Bax, CERT, Bcl-xL) Interaktionspartner, als auch neue Kandidaten: Der Apoptose-induzierende Faktor 2 (Aifm2), das Amyloid beta A4-Protein (APP), Bud31, das Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Zwischenkompartiment Protein 1 (Ergic1), Galectin-1 (Gal1), Galectin-3 (Gal3), die Serin/ Threonin-Proteinkinase mTor, das Mitochondrium-innere Membranprotein Oxal1 und die Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (Ppt1). Diese Protein-Kandidaten wurden auf Basis funktionaler Annotationen und ihrer möglichen Implikation in Ceramid-vermittelten Signalwegen ausgewählt.

Bis heute sind fünf AIF-Isoformen bekannt, zu diesen gehören AIF, AIFsh, AIFsh2, AIFsn3 und die Neuronen spezifische Isoform AIF2.³⁰¹ Sie gehören zu den mitochondrialen Oxidoreduktasen, die in pathologischen Situationen aus den Mitochondrien, sehr wahrscheinlich durch einen mitochondrialen Kanal, freigesetzt werden³⁰² und zum Kern weiter transportiert werden, was die Chromatin Kondensation und den Zelltod in einer Caspase-unabhängigen Weise auslöst.³⁰³

Das Amyloid beta A4-Protein (APP) ist an der Bildung des amyloiden Plaques beteiligt, der im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden wurden. Obwohl bereits eine Schlüsselrolle für Ceramide in der Pathogenese dieser Krankheit in den Fokus gerückt sind,³⁰⁴ wurde bisher keine direkte Modulation von APP durch Sphingolipide nachgewiesen.³⁰⁵

Bud31 ist eine Komponente des Kernspleißosoms, welches eine wesentliche Rolle bei der prä-mRNA-Spleißung spielt. Eine wachsende Zahl von Beweisen deutet darauf hin, dass Sphingolipide auch zelluläre Prozesse durch Vermittlung der Expression von Genen modulieren können. Als Beispiel wurde gezeigt, dass Ceramide die Expression der reversen Transkriptase der menschlichen Telomerase (hTERT) herunterregulieren und die Expression von Bcl-xL hochregulieren können. Über den detaillierten Mechanismus, der diesen Prozessen unterliegt, ist allerdings noch sehr wenig bekannt. Allerdings scheint die Herunterregulierung von hTERT durch die erhöhte Proteolyse des cMyc-Transkriptionsfaktors verursacht zu werden³⁰⁶, wohingegen die Hochregulation von Bcl-xL vermutlich durch eine Aktivierung der Phosphatase PP1, sowie durch eine anschließende Dephosphorylierung von SR-Proteinen vermittelt wird.²⁶⁰ Zusätzlich wurde Ceramiden eine direkte Rolle in der Regulation des alternativen Spleißens innerhalb des Spleißosoms zugesprochen.³⁰⁷ Das Protein Ergic1 ist verantwortlich für die Transportmaschinerie zwischen ER, dem Intermediatraum und dem Golgi-Apparat³⁰⁸, und Oxa1l verbindet zum einen mitochondriale Ribosomen mit der Membran und spielt

zusätzlich eine wichtige Rolle in der Insertion in die mitochondriale Innenmembran mitochondrial synthetisierter Proteine.³⁰⁹ Galectin-1 und Galectin-3 gehören zur Familie der β -Galactosid-erkennenden Proteine. Diese Proteine üben viele biologische Funktionen aus. Sie binden Glykonjugate und erleichtern so die Zell-Zell-Wechselwirkungen, und sie haben auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose. Die detaillierten Mechanismen ihrer Funktion bleiben bisher noch unklar.³¹⁰ Das Säugetierziel von Rapamycin (mTOR) ist eine Nährstoff-Sensorkinase mit einer entscheidenden Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums und des Stoffwechsels. Darüber hinaus ist die Deaktivierung von mTOR bei der Dephosphorylierung ebenfalls stark mit der Autophagieinduktion korreliert. Außerdem wurde berichtet, dass Ceramide selbst eine Rolle bei der Regulierung der Autophagie spielen. Diese Funktion kann auf mehreren Ebenen wie Veränderungen in der Autophagie-Maschinen, Modulation der Membran-Eigenschaften oder Änderungen im Verhältnis zwischen verschiedenen Sphingolipiden auftreten.³¹¹ Das letzte Protein der Liste, PPT1, ist eine Protein-Thioesterase, die an S-palmitoylierten Proteinen gebundene Fettsäuren spaltet. Es befindet sich im Lysosom und seine Dysfunktion korreliert mit der infantilen neurodegenerativen Krankheit CLN1.³¹²

8.5.1 Competitions Versuche

Um eine erste Einschätzung über die potenziellen Ceramid-bindenden Proteine zu erhalten, wurden diese nach der Isolation mit immobilisiertem ω N₃C16Cer-Kügelchen aus den N2a-Zelllysaten validiert. Die Assoziation des jeweiligen Proteins wurde durch SDS-PAGE und Westernblotting unter Verwendung der entsprechenden Antikörper bei verschiedenen Verdünnungen untersucht. Dabei wurde von einer positiven Wechselwirkung ausgegangen, wenn die Proteine als Treffer in fünf von fünf unabhängigen Experimenten identifiziert werden konnten (Anhang Abbildung 77). Als Ergebnis dieser Studien (Tabelle 8) konnten Assoziationen von Ceramid gegen Aifm2, APP, Bud31, Gal1, Gal3, mTor und PPT1 bestätigt werden, während die mitochondrialen Proteine Ergic und Oxa1l als potentielle interagierende Kandidaten verworfen wurden. Weiter konnte die Interaktion zwischen den Interaktionspartnern Bax, Bcl-xL und CERT bestätigt werden.

Tabelle 8: Übersicht der 12 ausgewählten potenziellen Interaktionspartner und die Ergebnisse ihrer Validierung nach Competitions Experimenten. +: Positiv, Bande im Westernblot. -: Negativ, keine Bande im Westernblot.

Protein	Name	1	2	3	4	5
Aifm2	Apoptosis-inducing factor 2	+	+	+	+	+
APP	Amyloid beta (A4) precursor protein (Alzheimer disease)	+	+	+	+	+
Bax	Apoptosis regulator BAX	+	-	+	+	-
Bcl-xL	Bcl-2-like protein 1 (Bcl-xl or B2CL1)	+	+	+	+	+
Bud31	Protein BUD31 homolog	+	+	+	+	+
Ergic1	Endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate 1	-	-	-	-	-
Gal1	Galectin 1	+	+	+	+	+
Gal3	Galectin 3	+	+	+	+	+
mTor	Serine/Threonine-protien kinase mTOR	+	+	+	+	+
Oxa1l	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L	-	-	-	-	-
PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1	+	+	+	+	+
CERT	Collagen type IV alpha-3-bindinG-Protein (cer transfer protein)	+	+	+	+	+

Um die Spezifität der Ceramid-Protein-Wechselwirkungen weiter zu untersuchen, wurde ein kompetitiver Bindungsassays durchgeführt. Dazu wurden Neuro-2a-Zelllysate vor der Zugabe der jeweiligen immobilisierten Sonde (Abbildung 62) mit einem Überschuss an C16-Cer (50-800 μ M) für zwei Stunden vor der Zugabe des immobilisierten Ceramids behandelt. Die Assoziation der Zielproteine mit der immobilisierten Sonde wurde weiter mittels Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit des unmarkierten Ceramids die Assoziation der Proteine mit den ω N₃C16Cer-Kügelchen in einer dosisabhängigen Weise verhinderte, wohingegen kein Proteinsignal in den mit der Negativkontrolle modifizierten Agarose nachgewiesen werden konnte, was nahelegt, dass die Proteine direkt mit Ceramiden interagieren (Anhang Abbildung 78).

Kettenlängenspezifische Effekte von Ceramiden wurden bereits in mehreren zellularen Prozessen beobachtet. In Hirngewebeproben von AD-Patienten steigen beispielsweise die Werte von C18 und C24-Cer an, während C16, C20 und C22-Cer unverändert bleiben.³¹³ Zudem ist bekannt, dass das Ceramid-Transport Protein CERT die Bindung an C-16 und C18-Ceramiden gegenüber langkettigen Ceramiden, wie Cer-24, präferiert³¹⁴, wohingegen der Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 2A (I2PP2A) die Bindung an Biotin-markierte C-18-Spezies vorzieht und gar nicht an C-16-Spezies zu binden scheint.²⁷⁷

Aus diesem Grunde sollte ferner untersucht werden, ob die identifizierten Proteine ebenfalls eine kettenlängenspezifische Bindung gegenüber Ceramiden zeigen. Dazu wurden erneut konkurrierende Experimente in Gegenwart von C18-Cer und C24-Cer durchgeführt.

Die Daten zeigten, dass APP, BCL-XL, mTOR und PPT1 bevorzugt C16-Cer gegenüber anderen Ceramid-Spezies binden, während AIFm2, BUD31 und Gal3 eine ähnliche Bindungspräferenz für C16- und C18-Cer aufweisen, aber C24-Cer mit niedrigerer Affinität binden. Für Gal1 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ceramid-Spezies beobachtet werden (Abbildung 69).

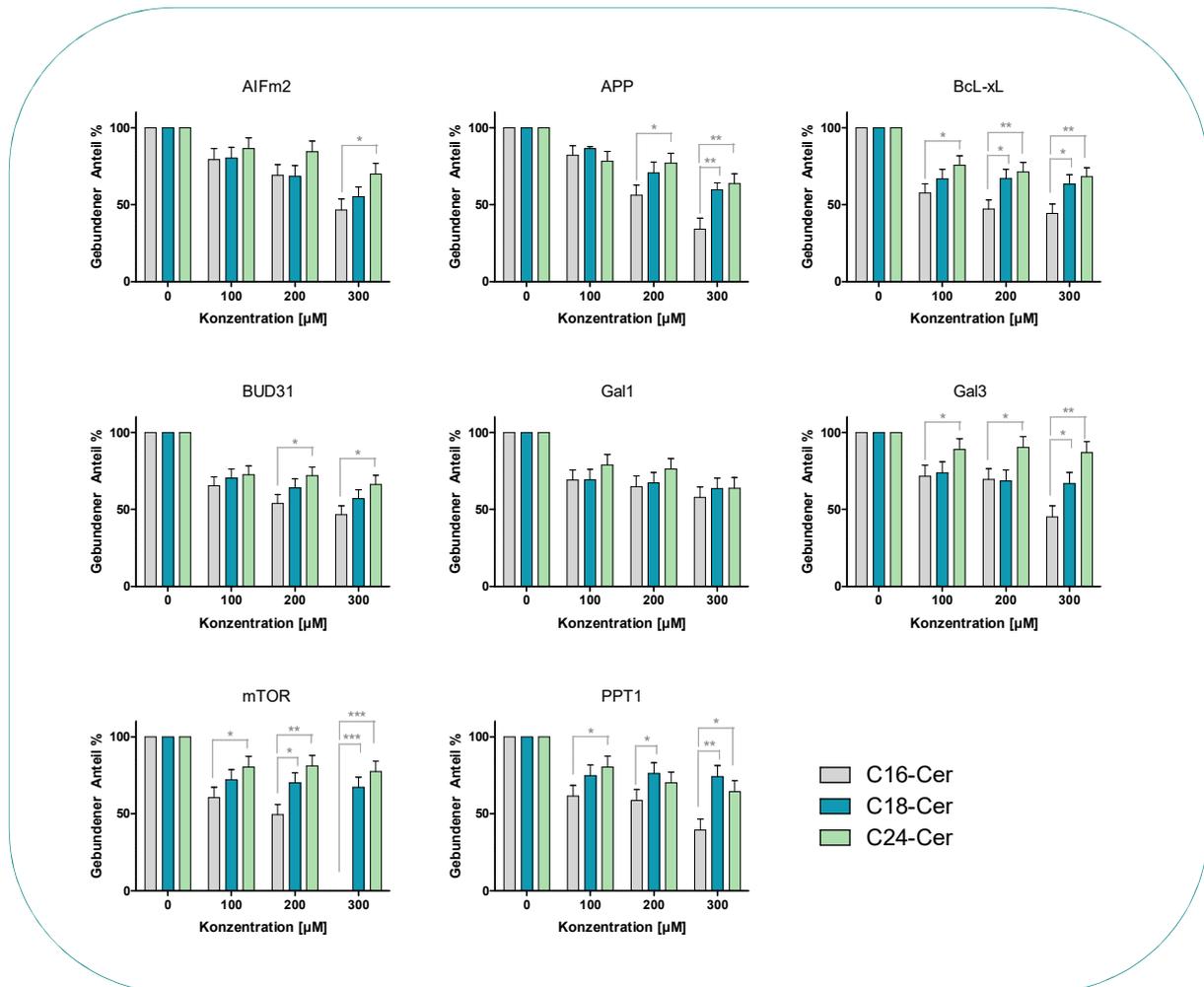


Abbildung 69: Competitions Versuch der wN₃C16Cer-Interaktion mit Proteinen unter Verwendung von C16-, C18- und C24-Cer als Konkurrenten. Die N2a-Zelllysate wurden vor der Zugabe der an Agarose gebundenem wN₃C16Cer mit zunehmenden Konzentrationen der freien Ceramide behandelt. Die Verifizierung erfolgte durch Westernblots mit kommerziellen Antikörpern spezifisch für jedes Protein. Der Proteingehalt wurde auf die unbehandelten Proben normalisiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit SD; n=3. *P < 0,05, **P < 0,001, Student's t Test.

Um das Bindungsverhalten der Proteinkandidaten weiter zu studieren, sollte im Weiteren die zelluläre Wechselwirkung zwischen dem C16-Ceramid und den ausgewählten Interaktionspartnern mit Hilfe des zellulären thermalen Shift-Assays (CETSA) untersucht werden.

8.5.2 CETSA (Zellulärer Thermaler Shift-Assay)

Der zelluläre thermale Shift-Assay (CETSA) ermöglicht die Bestimmung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen unter physiologisch relevanten Bedingungen, wie innerhalb von Zellen oder Zellextrakten. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass ein Protein, das an einen Liganden komplexiert ist, dazu neigt, widerstandsfähiger gegenüber einer wärmeinduzierten Entfaltung zu werden. Als Ergebnis ist eine Verschiebung der Proteinschmelztemperaturen (T_m) ein starker Hinweis auf die Bindung des Liganden an das Protein.³¹⁵ Im Zuge des Assays werden Zellen oder Zellextrakte auf unterschiedliche Temperaturen erwärmt und die Auswirkungen der Liganden auf die thermische Stabilität des Zielproteins untersucht (Abbildung 70). Die meisten Proteine entfalten und aggregieren bei definierten Temperaturen. Eine anschließende Analyse der jeweiligen löslichen Fraktionen (z.B. durch Westernblots) führt zu einer Protein-Aggregationskurve, die typischerweise durch den gebundenen Liganden verschoben wird.³¹⁵

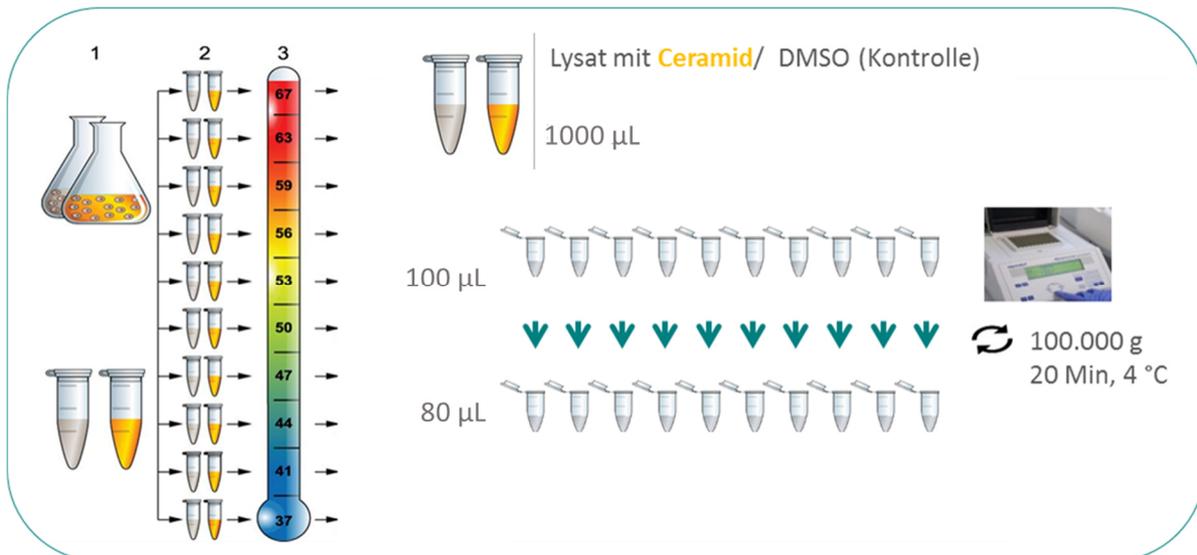


Abbildung 70: Schematische Darstellung des CETSA³¹⁵

Um ein optimales Ergebnis innerhalb dieser Studien zu erzielen, wurden die Ceramidverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen (10 – 200 µM) ausgetestet. Bei Konzentrationen im Bereich von 10 bis 20 µM konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Zu hohe Konzentrationen (200 µM) führten zu einem Ausfall der Proteine, sodass keine Bestimmung mehr möglich war. Letztendlich erwies sich eine Endkonzentration von 100 µM der Ceramid-Verbindungen als ideal, um diesen Versuch durchzuführen. Die Zellslysate wurden mit und ohne C16-Cer (100 µM) inkubiert und auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt (Abschnitt 8.5.2). Nach dem Abkühlen wurden die Proben zentrifugiert, um lösliche Fraktionen von ausgefällten Proteinen zu trennen. Die Anwesenheit des Zielproteins in der löslichen Fraktion wurde weiter durch Westernblots analysiert. Die Bindung des Ceramids an die Zielproteine wurde als positiv bewertet, wenn bei einer bestimmten Temperatur mehr Protein in der mit Ceramid behandelten Gruppe im Vergleich zur DMSO-behandelten Gruppe signifikant nachgewiesen werden konnte. Das bekannte Ceramid-Transportprotein CERT wurde als Positivkontrolle mit in die Experimente einbezogen (Abbildung 71).

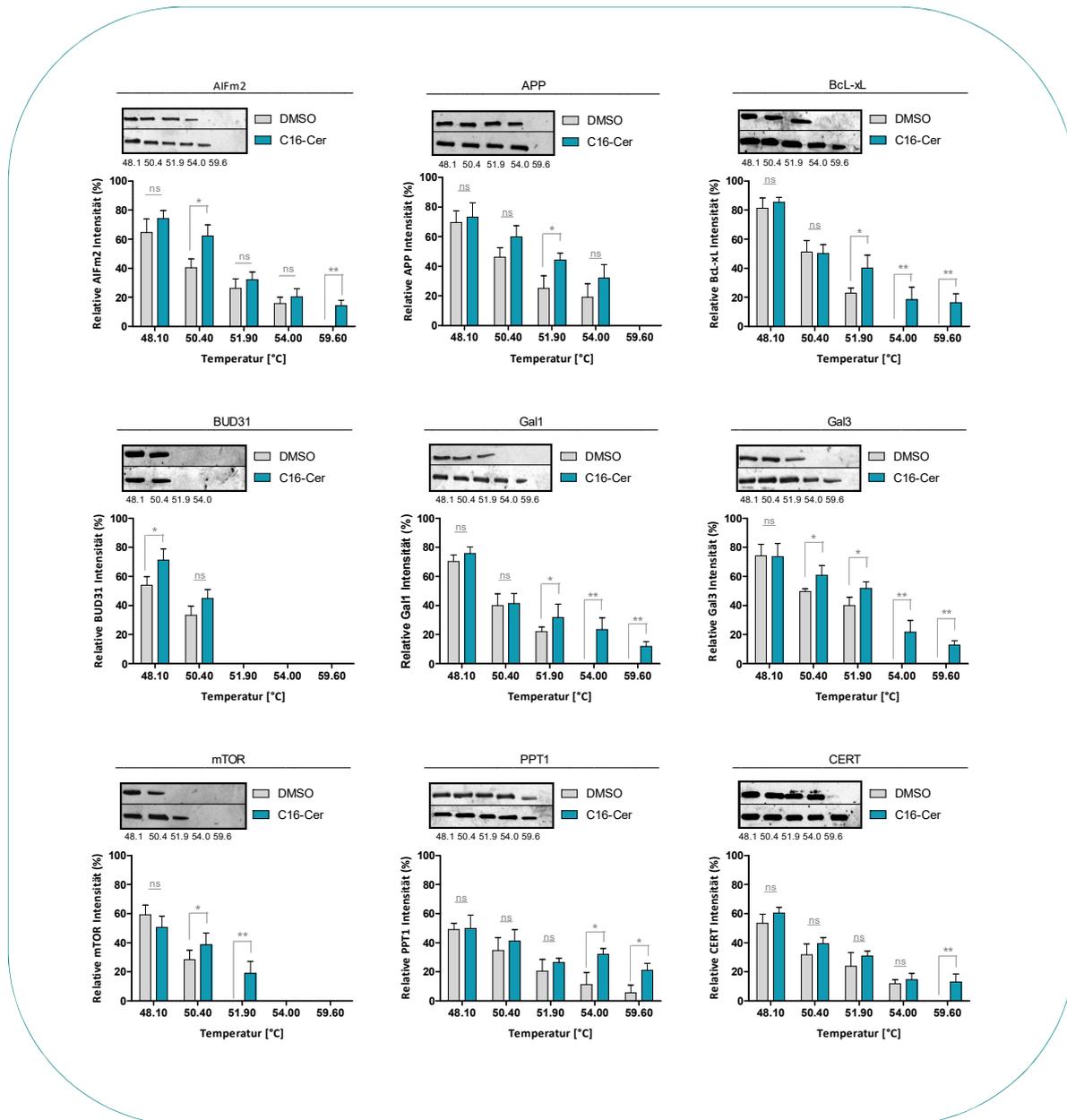


Abbildung 71: Graphische Auswertung und repräsentative Westernblots nach dem CETSA. Die Daten sind angegeben als Mittelwert mit SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, Student's t Test.

Die Behandlung der Lysate mit C16-Cer ergab in jedem Fall eine Erhöhung der thermischen Stabilität des Proteins, was darauf hinweist, dass C16-Cer die untersuchten Proteine bindet und diese Bindung eine Stabilisierung auslöst, was wiederum eine Protein-Lipid-Wechselwirkung bestätigt. Diese Stabilisierung war in den meisten Fällen signifikant und in anderen (APP, BUD31, PPT1) nur leicht zu erkennen; aber in allen Fällen sehr reproduzierbar (Abbildung 71, Anhang Abbildung 79A).

Um auszuschließen, dass die Bindung der Proteine an das Ceramid auf die hydrophobe Natur des Lipids zurückzuführen ist, wurde die Wirkung der Palmitinsäure auf die thermische Stabilität von AIFm2 und mTOR getestet.

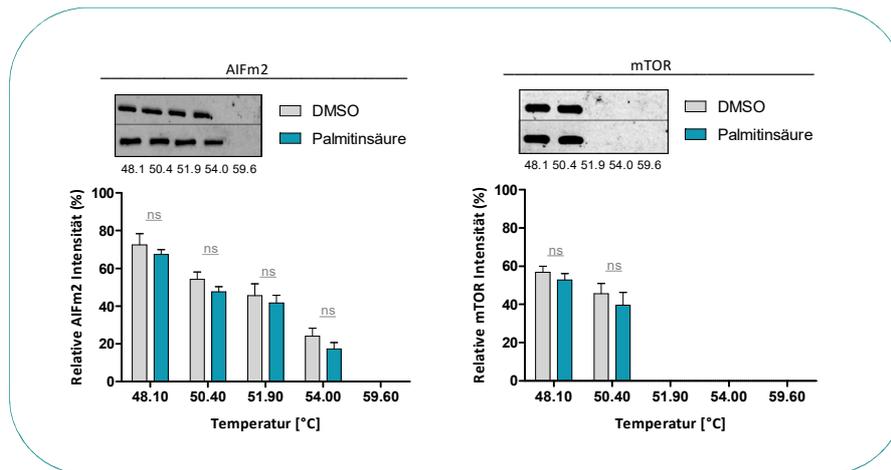


Abbildung 72: Graphische Auswertung und repräsentative Westernblotts der Kontrollexperimente mit Palmitinsäure nach CETSA. Die Daten sind angegeben als Mittelwert mit SD. *P < 0.05, **P < 0.001, Student's t Test.

In beiden Fällen konnte keine Stabilisierung festgestellt werden, was darauf hinweist, dass der beobachtete Effekt durch die spezifische Wechselwirkung von C16-Cer mit diesen Proteinen verursacht wird (Abbildung 72, Anhang Abbildung 79B).

Um die Stärke einer Wechselwirkung zwischen Proteinen und ihren Interaktionspartnern zu verstehen, sollte in einer quantitativen Analyse untersucht werden, ob Ceramide die identifizierten Ziele direkt in vitro binden. Dazu sollten aufgereinigte Proteine mittels DSF (Differential Scanning Fluorimetrie) untersucht werden.

8.5.3 Das Prinzip der Differentialen Scanning Fluorimetrie

Eine Vielzahl von Molekülen, einfachen Ionen bis hin zu großen Makromolekülen, sind in der Lage, Proteine mit unterschiedlichen Affinitäten zu binden. In vielen Fällen binden Proteine als Teil ihrer normalen Funktion an kleine Molekülpartner (z.B. eine Kinasebindung an ATP), aber sie können auch miteinander wechselwirken ohne dabei eine direkte Funktion auszuüben. Dabei fungieren sie als Werkzeuge, wie beispielsweise kleine Moleküle die Proteine stabilisieren, um den Kristallisationserfolg zu verbessern, oder aber sie binden direkt an die aktive und allosterische Bindungstasche die Proteine und fungieren als Inhibitoren, um die Aktivität von Enzymen zu modulieren. Es gibt bereits eine breite Palette von Techniken, um die Affinität von Proteinen für ihre Interaktionspartner zu bestimmen. Die isotherme Titrationskalorimetrie³¹⁶ wird weithin als Gold-Standard angesehen, da sie zahlreiche Informationen über Reaktionen liefert und ohne eine Markierung der Proben funktioniert. Allerdings ist diese Methodik trotz der jüngsten Verbesserungen im Bezug auf Empfindlichkeit und Automatisierung des Versuchsaufbaus immer noch eine relativ teure Methodik, da spezielle Proteinanforderungen nötig sind, sie lediglich einen niedrigen bis mittleren Durchsatz hat und sich am besten für Wechselwirkungen mit moderaten bis hin zu hohen Affinitäten (10 nM bis 100 μ M K_D) eignet.³¹⁷ Andere Methoden wie die Oberflächen-Plasmon-Resonanz oder Doppelschicht-Interferometrie³¹⁸ bieten höhere Durchsätze und haben eine bessere Empfindlichkeit, um auch kleinere Moleküle (100 Da) zu erkennen. Allerdings sind die hohen Durchsatzinstrumente für diese Methoden vergleichsweise teuer und lassen sich zumeist nur dort rechtfertigen, wo es einen kontinuierlichen Durchsatz von relevanten Projekten gibt. Zudem sind sie sehr häufig unzugänglich für viele akademische Laboratorien.

Die DSF (Differential Scanning Fluorimetrie) wurde im Jahr 2001 als Methode zur Wirkstoffforschung entwickelt und erstmals beschrieben. Bei diesem Verfahren werden Proteine mit einem

Fluoreszenzfarbstoff (SYPRO Orange) inkubiert, der seine Fluoreszenz bei der Bindung an die hydrophoben Regionen der Proteine verändert. Die Proteinfarbstoffprobe wird nach der Inkubation erhitzt und die Fluoreszenz wird bei ansteigender Temperatur gemessen. Die Entfaltung des Proteins und die Exposition der hydrophoben Teile des Proteins führen zu einem charakteristischen Muster in der Fluoreszenz, die als Funktion der Temperatur aufgetragen werden kann. Von Vorteil ist, dass das Experiment in kleinen Volumina (20 μL) und in einem kommerziell erhältlichen quantitativen PCR-Instrument durchgeführt werden kann. So kann in einem einzigen Experiment eine Vielzahl von Proben in hohem Durchsatz getestet werden.^{319,320}

8.5.3.1 Bestimmung der K_D mittels DSF

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen den gefundenen Proteinen und dem interagierenden kleinen Ceramid wurden die humanen Proteine AIFm2 und BCL-XL in *E. coli* mit einem Hexahistidinyl-Tag exprimiert. Gal1 wurde wie von Mejuch et al. zuvor beschrieben exprimiert.³²¹ Alle Proteine wurden durch Ni-Affinitätschromatographie gereinigt und waren für die weiteren biochemischen Experimente ausreichend rein (Abschnitt 10.3.11). Anschließend wurde das C16-Cer auf Bindung an die humanen Proteine getestet. Analog zum CETSA, der in Zelllysaten durchgeführt wird, bewirkt das im DSF-Assay anwesende kleinmolekulare Bindemittel die thermische Stabilisierung des Proteins. Diese Stabilität kann durch die Erhöhung der Schmelztemperatur (T_m) des Protein-Ligandenkomplexes (T_m) im Vergleich zu dessen Apoproteins bestimmt werden. Der DSF-Assay wurde mit einer Proteinkonzentration von 0.25 mg/ mL und einer Ceramidkonzentration im Bereich von 100 bis 0 μM durchgeführt (Abbildung 73A).

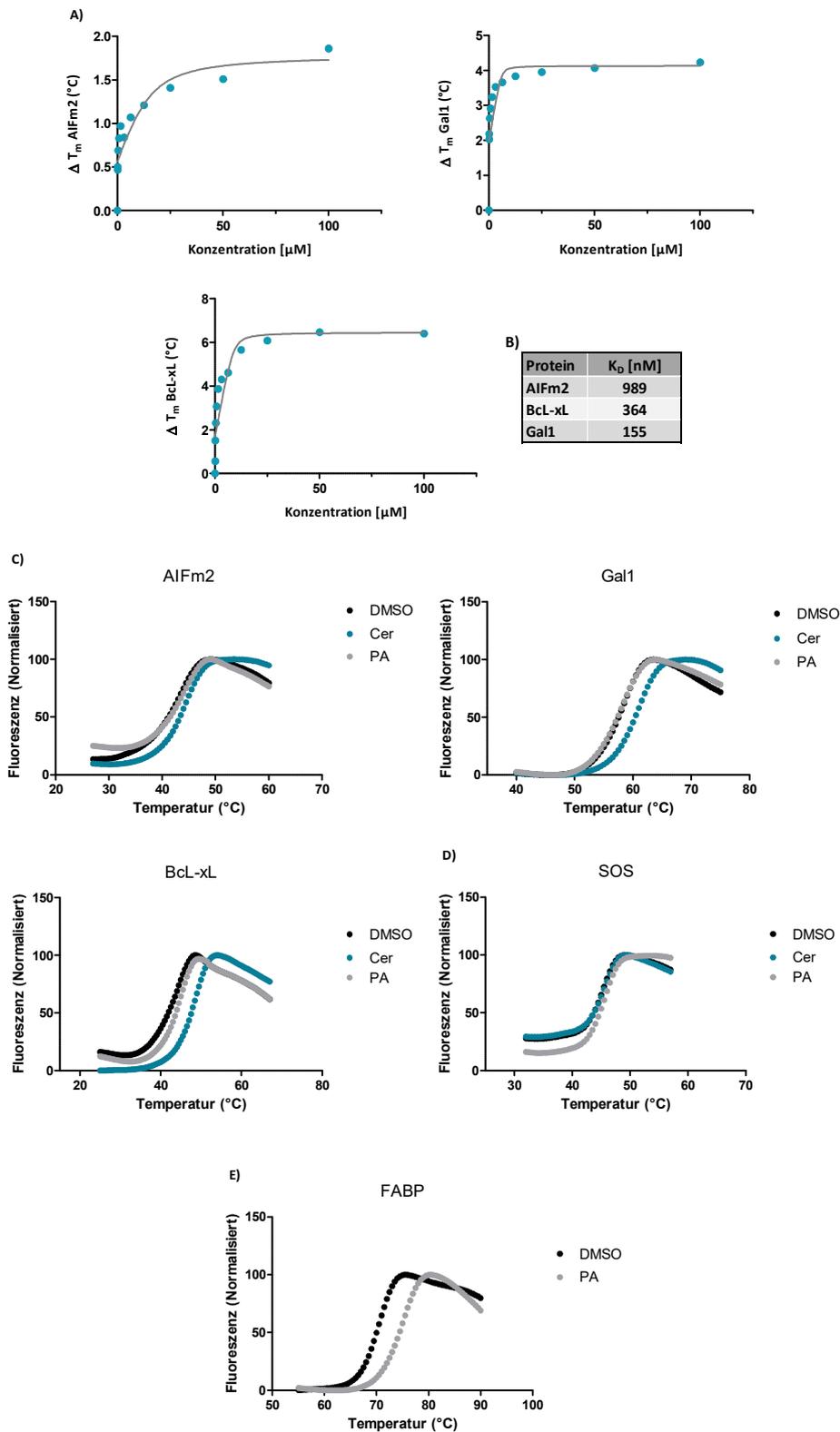


Abbildung 73: Differential Scanning Fluorimetrie (A) Konzentrationsabhängige Stabilisierung von AIFm2, Gal1 und Bcl-xL durch C16-Ceramid. Die T_m wurde für 0.25 mg/mL des Proteins in PBS-Puffer pH 7.5 mit einer Ceramid-Konzentration zwischen 100 und 0 μM gemessen. Die Daten repräsentieren eine exponentielle Anpassung der ΔT_m -Werte gegen die Ceramid Konzentrationen; (B) Bindungsaffinitäten der Wechselwirkung zwischen C16-Cer und den getesteten Proteinen. (C) Untersuchung der thermischen Stabilisierung durch 50 μM C16-Ceramid im direkten Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und

der negativ Kontrolle Palmitinsäure. (D) Untersuchung der thermischen Stabilisierung von SOS durch 50 μM C16-Ceramid im direkten Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und der negativ Kontrolle Palmitinsäure. (E) Untersuchung der thermischen Stabilisierung von FABP durch 10 μM Palmitinsäure im direkten Vergleich mit der DMSO-Kontrolle

C16-Cer führte bei den Proteinen Gal1 bzw. Bcl-xL zu einer Stabilisierung von 4 °C bzw. 6 °C bei einer getesteten Konzentration von 50 micromolar. Eine schwächere Bindung konnte für AIFm2 mit entsprechenden ΔT_m -Werten von 2 °C beobachtet werden (Abbildung 73C).³¹⁹

Es konnten keine nachweisbaren Temperaturverschiebungen beobachtet werden, wenn AIFm2 und Gal1 mit zunehmenden Konzentrationen von Palmitinsäure titriert wurden (Abbildung 73C) oder wenn C-16-Cer gegen *Son of Sevenless* (SOS) Protein als Negativkontrolle getestet wurde (Abbildung 73D). Um die Aktivität der Palmitinsäure im DSF Assay zu überprüfen, wurde FABP, ein Fettsäuren bindendes Protein³²² ebenfalls mit zunehmenden Konzentrationen der Palmitinsäure titriert. Dabei zeigte sich eine entsprechende Stabilisierung von 5 °C.

Nimmt man all diese Experimente und Kontrollexperimente zusammen, so lässt sich auf eine spezifische Bindung zwischen AIFm2 bzw. Gal1 und Ceramid schließen.

9 Zusammenfassung

Die Wichtigkeit der Rolle von Ceramiden als bioaktives Lipid ist bereits durch eine Vielzahl von Studien bekannt. Dennoch konnten die genauen Mechanismen, mit denen es als Signalmoleküle fungiert, bis heute nicht entschlüsselt werden. Die Identifizierung neuer ceramidbindender Proteine könnte zu einem detaillierten Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Ceramid-Signalwege beitragen. Bisher konnten nur wenige ceramidbindende Proteine identifiziert werden und ihre Anzahl reicht nicht aus, um alle Funktionen und Aufgaben der Ceramide zu verstehen. Darüber hinaus haben nur relativ wenige Studien eine proteomweite Identifizierung von Ceramid-bindenden Proteinen überhaupt versucht. Bisher wurden radioaktiv markierte^[245] oder biotinylierte Ceramide genutzt^[213], um neue spingosinbindende Proteine zu finden. Allerdings können die verkürzten Acylketten und die Gegenwart eines Biotins das Verhalten der Sonden und deren Affinität zu Proteinen stark beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde ein Azido-markiertes C16-Ceramid hergestellt und es konnte gezeigt werden, dass es als Sonde für die Anreicherung und Identifizierung von ceramidbindenden Proteinen eingesetzt werden kann. Um die Identifizierung von Proteinen zu verhindern, die nur auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen gebunden werden könnten, wurde ein Fettsäurederivat als Negativkontrolle verwendet. Zur Erzeugung einer Kandidatenliste von ceramidinteragierenden Proteinen wurden zwei Methoden angewendet: ein massenbasierter Proteomansatz und ein Proteom-Mikroarray.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden erst einmal potentielle Kandidaten für die weiteren Validierungen ausgewählt, von denen viele neuartige Interaktionspartner darstellen: der Apoptose-induzierende Faktor Aifm2, das Amyloidvorläuferproteine APP, das Spleißosom-verwandte Protein Bud31, die Galectine Gal1 und Gal3 die Kinase mTOR und die Protein-Thioesterase PPT1. Die Spezifität dieser Proteine gegenüber Ceramid-Spezies mit unterschiedlichen Kettenlängen wurde ebenfalls analysiert. Zelllysate aus N2a-Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von C16-, C18- und C24-Cer vorbehandelt und mit Ceramid-modifizierten Agarosekügelchen inkubiert, wobei eine dosisabhängige Abnahme der Wechselwirkung des Lipids mit den untersuchten Proteinen beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde eine bemerkenswerte Spezifität für kurzkettige Ceramide, hauptsächlich C16-, aber in einigen Fällen auch C18-Ceramide, gezeigt, was darauf hindeutet, dass die spezifische Wechselwirkung funktionell signifikant sein kann. Die Verwendung eines C16-Cer (ω N₃C16Cer) als Pull-Down-Probe könnte der Grund für die beobachtete Spezifität sein. Um die Bindung von Ceramid an die identifizierten Proteine weiter zu untersuchen, wurde ein zellulärer thermischer Verschiebungssassay (CETSA) angewendet. Die Behandlung der Zelllysate mit den C16-Ceramiden führte zu einer geringen Stabilisierung von APP, Bud31 und PPT1 und einer spürbaren Erhöhung der thermischen Stabilität für die anderen untersuchten Proteine. Schließlich wurde die direkte Wechselwirkung von C16-Cer in vitro unter Verwendung eines DSF mit rekombinant exprimierten Proteinen untersucht. AIFm2, Bcl-xL, Gal1 wurden ausgewählt und eine direkte Wechselwirkung mit variablen Affinitäten konnte in allen drei Fällen nachgewiesen werden, während keine Bindung beobachtet werden konnte, wenn AIFm2 und Gal1 mit zunehmenden Konzentrationen von Palmitinsäure titriert wurden oder wenn C-16-Cer gegen das *Son of Sevenless* (SOS) Protein als Negativkontrolle getestet wurde.

Zukünftige Experimente sind nun erforderlich, um zu verstehen wie die Bindungen der Ceramide die Proteinfunktion beeinflussen. Beruht sie auf einer Modulation der Proteinlokalisierung wie im Falle der Bindung von LC3B an Mitochondria oder regelt es die Proteinfunktion, wie beispielsweise im Falle der Aktivierung der Proteinphosphatase PP2A.

Allerdings besitzt der hier gewählte Ansatz auch Limitierungen. Durch die Abwesenheit einer kovalenten Bindung zwischen dem Ceramid und den interagierenden Proteinen kann die Detektion von Interaktionspartnern auf hochaffine Proteine beschränkt sein und integrale Proteine ausschließen. Darüber hinaus konnte neben der Bindungsspezifität für C16-Ceramide auch eine gewisse Affinität der Bindungspartner gegenüber anderen Ceramidspezies mit unterschiedlichen Kettenlängen beobachtet werden. Es wäre daher durchaus interessant, die Analyse auf andere Ceramidspezies zu erweitern, wodurch zusätzliche ceramidinteragierende Proteine identifiziert werden könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination einer massenbasierten Proteomanalyse mit einem Protein-Mikroarray zu einer effektiven Liste potentieller ceramidbindender Proteine, einschließlich bekannter und unbekannter Interaktionspartner, führte. Durch eine Vielzahl von Validierungen in Zelllysaten, sowie durch *in vitro* Techniken, gelang die Identifizierung von unbekanntem Ceramidbindern, einschließlich des Apoptose verwandten Proteins AIFm2, dem mit der Alzheimer-Krankheit verbundenen APP, dem Spliceosom Protein Bud31, den mit Krebs in Verbindung gebrachten Gal1 und Gal3, der aktivierten Nährstoffsensorkinase mTOR und der Thioesterase PPT1. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Rolle von Ceramiden bei der Regulation von zellulären Prozessen weiter zu beleuchten.

10 Experimenteller Teil

10.1 Methoden und Messgeräte

Reagenzien, Edukte und Lösungsmittel wurden von den Firmen Fischer Scientific, Acros Organics, Alfa Aesar, Merck Chemicals, IRIS Biotech, Life Technologies, Sigma Aldrich und TCI Europe erworben. Lösungsmittel für Schutzgas-basierte Reaktionen wurden in trockener Qualität (*anhydrous*) bezogen und verwendet. Alle weiteren Lösungsmittel wurden in *analytical-grade* Qualität erworben und ohne weitere Behandlung eingesetzt. Insbesondere für die Extraktionsversuche wurden Lösungsmittel mit dem Reinheitsgrad CHROMASOLV[®] eingesetzt.

Dünnschichtchromatogramme wurden mit Hilfe von DC-Folien der Firma Merck (Kieselgel 60, F254, Schichtdicke 0.2 mm) angefertigt. Die Visualisierung erfolgte entweder mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder durch Verwendung von Färbelösungen:

Permanganat-Lösung: 1 g KMnO_4 , 6.6 g K_2CO_3 , 1.7 mL 5 % NaOH (aq) in 100 mL H_2O

Ninhydrin-Lösung: 0.3 g Ninhydrin, 3 mL AcOH in 100 mL EtOH

Säulenchromatographische Reinigungen wurden an Kieselgel der Firma Acros Organics (40 – 65 μm , 230 – 400 mesh) durchgeführt.

Spezifische Drehwerte wurden an einem Schmidt & Hansch Polartronic HHP Polarimeter, bezogen auf die Natrium-D-Linie (589 nm), bei Raumtemperatur ermittelt. Weitere Angaben sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

NMR-Spektren wurden an Geräten der Firma Bruker (Avance DRX-400 und Avance DRX-500) und der Firma Agilent Technologies (Mercury VX 400, Inova-500 und Inova-600) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben und beziehen sich auf das Restsignal des nicht deuterierten Lösungsmittels. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hertz [Hz]. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = breites Signal.

Verwendete deuterierte Lösungsmittel:

Deuteriochloroform (CDCl_3 : $\delta = 7.26 \text{ ppm}$ (^1H), $\delta = 77.16 \text{ ppm}$ (^{13}C))

Hexadeuteroacetone (Aceton- D_6 : $\delta = 2.05 \text{ ppm}$ (^1H), $\delta = 29.84 \text{ ppm}$ (^{13}C))

Hexadeuterodimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$: $\delta = 2.50 \text{ ppm}$ (^1H), $\delta = 39.52 \text{ ppm}$ (^{13}C))

Gaschromatographie-Massenspektren (GC/MS) wurden an einem Gerät der Firma Agilent (Agilent 7890A GC System, Säule: Agilent DB-5MS) aufgenommen. Die Massendetektion erfolgte durch einen gekoppelten Massendetektor der Firma Agilent (Agilent 5975 inert XL MSD). Elektronenstoß-Ionisation (EI, 70 eV) als Ionisierungsmethode verwendet.

Analytische Flüssigchromatographie-Massenspektren (Analyt. HPLC-MS) wurden an einem Gerät der Firma Thermo Fisher Scientific (Ultimate 3000) unter Verwendung einer Nucleodur EC 125/3 C4-Säule oder einer EC 50/3 C18-Säule von Macherey & Nagel aufgenommen. Die Massendetektion erfolgte mit einem Gerät der Firma Thermo Fisher (LCQ Fleet). Als Ionisierungsmethode wurde heated *Electro-spray-ionization* (HESI) verwendet.

Präparative Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (Präp. HPLC-MS) erfolgte an einem Gerät der Firma Agilent (Agilent Series 1100/LC/MSD VL) unter Verwendung einer Nucleodur VP 125/10 C4-Säule oder einer VP 125/10 C18-Säule von Macherey & Nagel. Als Ionisierungsmethode wurde *Electro-spray-ionization* (ESI)

verwendet. Die UV Detektion erfolgte bei 210 und 254 nm. Die Flussrate betrug 6 mL/min. Als Lösungsmittel wurde A: 0.1 % TFA in Wasser und B: 0.1 % TFA in Acetonitril verwendet.

Die **Lyophilisierung** der Substanzen erfolgte in einem 2-4-alpha- oder 2-8-beta-Gefriertrockner der Firma Christ.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit Hilfe eines LTQ Orbitrap Spektrometers der Firma *Thermo Fisher* aufgenommen, das mit einem *Accela* HPLC-System gekoppelt war. Die Injektion erfolgte mittels *Flow Injection* mit einer Flussrate von 250 µL/min. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch (1:1) aus Wasser + 0.1% HCO₂H und Acetonitril + 0.1% HCO₂H verwendet.

Proteomische Massenanalyse (HRMS) wurden mit Hilfe eines Q-Exactive oder Q-Exactive plus oder Q-Exactive HF Spektrometers der Firma *Thermo Fisher* aufgenommen, das mit einem *Ultimate 3000* HPLC-System gekoppelt war. Die Analyse der Proben erfolgte unter Verwendung einer *Pepmap 100 C18-Säule*. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Wasser + 0.1% HCO₂H und Acetonitril + 0.1% HCO₂H verwendet.

Alle feuchtigkeits- und oxidationsempfindlichen Reaktionen wurden unter Standard Schlenk-Bedingungen mit Argon als Inert-Gas durchgeführt.

10.2 Materialien und Geräte der biologischen Experimente

10.2.1 Laborgeräte

Agarose Gel Chamber BioRad

Axiovert 200M mit Inkubator XL-3

Axiovert Observer Z1

BioPhotometer Eppendorf

Cell Counter, CountessTM Life TechnologiesTM

Gellogic 200 Imaging System KODAK

iCycler Thermal Cycler (iQ5) BioRad

ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System Molecular Devices

Inkubator Nuaire DHD Autoflow, NU5510E Nuaire

INFORS HT Minitron Standard, Bacterial Incubator INFORS HT

Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E

Leica SP5 Confocal Microscope Leica

LTQ Orbitrap XLTM Hybrid Ion Trap-Orbitrap MS Thermo Scientific

Magnetic racks Life TechnologiesTM

Magnetic Stirrer IKA[®]Werke

Mastercycler ep gradient S

MiniProtean 3 Gelelektrophorese System BioRad

Monolith NT.115, MST NanoTemper Tech

Mr. FrostyTM Freezing Container Thermo Scientific

MultidropTM Combi Reagent Dispenser Thermo Scientific,

NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer Thermo Scientific

NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer

Odyssey[®] FC Imaging System

Odyssey[®] Fc imaging System LI-COR Biosciences

Orbitor RS Microplate Mover Thermo Scientific

pH-Meter Mettler Toledo

Pierce™ G2 Fast Blotter
 Plattenlesegerät Infinite M200 Tecan
 Q-Exactive™ Hybrid Quadrupol MS Thermo Scientific
 Schüttler Eppendorf Thermomixer comfort
 SpeedVac Eppendorf
 Sterilbank Microflow NuncNalgene
 Sterilbank Nuaire
 Transferblocking Kammer BioRad
 Vakuumkonzentrator
 Vortex Genie 2 Roth
 Wasserbad (Mettler) Hettich AG
 xCELLigence RTCA DP ACEA Bioscience
 Zeiss Observer Z.1, inverse, fluorescence microscope Zeiss
 Zeiss, Visitron Systems, automatisches Mikroskop Zeiss,
 Zentrifuge Beckmann (Ultrazentrifuge)
 Zentrifuge Eppendorf 5415 R
 Zentrifuge Minispin

**Alle weiteren Laborgeräte entsprechen dem allgemeinen Standard.*

10.2.2 Chemikalien

2-Bromohexadecansäure #238422 Sigma Aldrich
 Acrylamid/N, N-Methylenbisacrylamid #A1672 AppliChem
 Agarose #15510-027 Invitrogen
 Agarose #16500500 ThermoFisher Scientific
 Ammoniumhydrogencarbonat #09830 Sigma-Aldrich
 Ammoniumpersulfat #13375 SERVA
 Ammoniumsulfat #A4418 Sigma-Aldrich
 Ampicillin, Natriumsalz #10460050 GERBU Biotechnik
 Arachidonsäure #A9673 Sigma-Aldrich
 Arachinsäure #A3631 Sigma-Aldrich
 AttoPhos® AP Fluorescent Substrate # TB280 Promega
 β-Mecaptoethanol #M3148 Sigma Aldrich
 Bovine Serum Albumin, (BSA) Fettsäure frei #A8806 Sigma Aldrich
 Bovine Serum Albumin, (BSA) # 11920 SERVA
 C16 Ceramid (N-Palmitoyl-D-erythro-sphingosin) # sc-201379 Santa Cruz Biotechnologie
 C18 Ceramid (N-Stearoyl-D-erythro-sphingosin) # sc-211176A Santa Cruz Biotechnologie
 C24 Ceramid (N-Lignoceroyl-D-erythro-sphingosin) # sc-202694 Santa Cruz Biotechnologie
 Chloramphenicol #3886.2 Roth
 cOmplete protease Inhibitor, EDTA frei #11873580001 Roche,
 Coomassie Brilliant Blue, G-250 #17524 Serva
 DAKO®Fluorescent Mounting Medium #53023 DAKO Corporation Capintaria
 DMSO #20385 SERVA
 DMSO, Zellkulture #EMR385100 Biozol
 DTE #10070025 GERBU Biotechnik
 DTT #1008 GERBU Biotechnik

EDTA #1034.1000 GERBU Biotechnik
 EGTA #E3889 Sigma Aldrich
 Formaldehyd #A0877.0500 AppliChem
 GelRed™ #BT41003 Biotium
 Glycerol #G5516 Sigma Aldrich
 HEPES (Ultrapure) #1009.0250 GERBU Biotechnik
 Heptadekansäure (C-17) #H3500 Sigma Aldrich
 Heptadekansäurechlorid (C-17) #306657 Sigma Aldrich
 Imidazole #8.14223.0250 Merck
 Iodacetamid #122270250 ACROS Organics
 Kanamycin sulfate #1091 GERBU Biotechnik
 Magermilchpulver #A0830 AppliChem
 Natriumdodecylsulfat (SDS) #L3771 Sigma Aldrich
 Nonadecansäure (C-19) #N5252 Sigma Aldrich
 NP-40 Alternative #492016 Calbiochem®
 Octadecansäurechlorid #171158 Sigma Aldrich
 Oelsäure #4954 Calbiochem®
 Oelsäure #O1008 Sigma Aldrich
 Oelsäurechlorid #367850 Sigma Aldrich
 Palmitinsäure-1,2,3,4-¹³C₄ # 489611 Sigma Aldrich
 Palmitinsäure #P5585 Sigma Aldrich
 Palmitinsäure #P9417 Sigma Aldrich
 Palmitoleinsäure #76169 Sigma Aldrich
 PBS Tablets #AK-1029P-I Jena BioScience
 Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads #88802 Thermo Scientific
 PIPES #P6757 Sigma Aldrich
 Ponceau S #P7170-1L Sigma Aldrich
 PhosSTOP, Phosphataseinhibitor #04906845001 Roche
 SlimFast Schoko #72768 SlimFast
 Stearinsäure #76137 Sigma Aldrich
 Stearinsäure #S4751 Sigma Aldrich
 Streptavidin Magnetic Beads #514205 NewEngland Biolabs
 TEMED #35925 SERVA
 Tetradekansäurechlorid #185205 Sigma Aldrich
 Tetramethylethylendiamin #T9281 Sigma Aldrich
 TFA #T6508 Sigma Aldrich
 TRIS #48552.2 Roth
 Triton® X-100 # 39795.02 SERVA
 Tween®-20 #BP337 Fisher BioReagents®

* Alle weiteren Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Roche, Roth oder Serva bestellt.

10.2.3 Verbrauchsmaterial

12-well Platten (Falcon) #353043 Corning Incorporated
 24-well Platten (Falcon) #353047 Corning Incorporated
 384-well Imaging Platten #3701 Corning Incorporated
 384-well Imaging Platten #3826 Corning Incorporated
 6-well plates (Falcon) #353046 Corning Incorporated

96-well Imaging Platten, high resolution #5241 Zellkontakt
96-well Imaging Platten, screening #3340 Corning Incorporated
96-well Platten (Falcon) #353072 BD Falcon™
Aqua Poly/Mount #53023 Polysciences
Carl Zeiss™ Immersol™ Immersion Öl #12-070-394 Thermo Fisher Scientific
Corning® Vakuum Filter #CLS430049 Corning Incorporated
Countess Counting Träger #C10283 Invitrogen
Deckgläser Ø 12 mm #P231.1 Carl Roth GmbH
DNA Ladungsfarbstoff, 6x # R0611 Thermo Fisher Scientific
DNA Zap #9891G Amnion®
Eppendorf Uvette® #634-1922 Eppendorf
Filter, Spritzen Filter #831826001 Sarstedt
FINNTIP, 10 µL #9900370 Thermo Fisher Scientific
FINNTIP, 50 µL #9900377 Thermo Fisher Scientific
Gradient Protein Gele (4-20%) #84713 Pierce, Thermo Fisher
iCycler iQ® PCR Platten, 96-well #2239441 BIORAD
Incidur® #3186407 Ecolab,
Küvetten, Standard #67.742 Sarstedt
Kyro Röhrchen #72.379.005 Sarstedt
Mini-PROTEAN®TGX™ Gele (4-20%) #456-1094 BIORad
MULTIWell™, E-Plate 16 (RTCA) #0569830001 ACEA Bioscience
Mycoplasma-ExSpray #PK-CC91 PromoKine
Neubauer-Zählkammer # PC72.1 Carl Roth
Objektträger Diagonal GmbH
Parafilm #PM-996 Roth
PCR Verchlüsse™, Microseal® 'B' Film #00253112 BIORAD
Petrischalen #83.1800 Sarstedt
Pipetten Spitzen, Filter #F171403 Gilson
Pipetten, Pasteur #747715 BRAND,
PVDF-Transfermembran (Immobilon®FL) #IPFL00010 Merck Millipore
Skalpelli #5518075 Braun
Spin Säulen # 84868 Thermo Fisher Scientific
Sterile Spitzen (versch. Größen) #various Braun,
Spritzen (1, 5, 20, 50 mL) #various Braun
Testgefäße (0.5, 1.5, 2 mL) # T9661 Eppendorf
Testgefäße (15, 50 mL) # T9661 Sarstedt
Testgefäße (low binding, 1-5 mL) #0030.108.11 Eppendorf
TLC Silica Gel Platten #1.05748.000 Merck Millipore
Trypan Blau Lösung #T10282 Life Technologies™
Whatman 3MM Papier Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen (versch. Größen) #353136 BD Falcon™
Zellkulturflaschen (versch. Größen) #83.3910/11/12 Sarstedt
Zellscharber, groß #831831 Sarstedt
Zellscharber, klein #353085 BD Falcon™

** Alle weiteren Laborgeräte entsprechen dem allgemeinen Standard.*

10.2.4 Fluorophore

Alexa Fluor® 488 Phalloidin #A12379 Life Technologies™
 BODIPY® 493/503 #D3922 Life Technologies™
 BODIPY® 558/568 C12 #D3835 Invitrogen™
 DAPI #D1306 Life Technologies™
 Dibenzoylklooktyn-PEG4-Fluor 545 (DIFO-545) #760773 Sigma Aldrich
 ER-Tracker™ Green (BODIPY®FL glibenclamide) #E34251 Life Technologies™
 GelRED™ # S420 GeneOn AG
 Hoechst 33342, Trihydrochloride #H1399 Life Technologies™
 LysoTracker® Red DND-99 #L7528 Life Technologies™
 MitoTracker® Deep Red 633 #M22426 Invitrogen™
 NHS-Flourescein #46410 Thermo Scientific

10.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften und Durchführungen der biologischen Experimente

10.3.1 Puffer und Lösungen

10.3.1.1 Puffer Molekularbiologie

PBS-Puffer:	PBS-T:	SEC-Puffer (NADH-Assay):
140 mM NaCl	140 mM NaCl	50 mM NaCl
10 mM Phosphatpuffer	10 mM Phosphatpuffer	50 mM HEPES
3 mM KCl	3 mM KCl	10 % Glycerol
pH 7.4	0.1 % (v/v) Tween-20	1 mM TCEP
	pH 7.4	0.01 % FOS-13
		pH 7.5

10.3.1.2 Puffer Zellbiologie

Lysepuffer:	HEPES Puffer:
50 mM NaCl	25 M HEPES
5 mM EGTA	40 mM NaCl
5 mM MgCl ₂	1 mM TCEP
0.1 % (v/v) NP-40	pH 7.5
0.1 % (v/v) Triton X-100	
0.1 % (v/v) Tween-20	Fixierungspuffer:
Proteaseinhibitor-Cocktail	3.7 % Formaldehyd in PBS
Phosphataseinhibitor-Cocktail	
pH 7.4	Permeabilisierungspuffer:
	0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS

10.3.1.3 Puffer und Lösungen für die Protein Biochemie

Blocklösung:	Coomassie Entfärbelösung:	Coomassie Färbelsg, kolloidal
140 mM NaCl	30% (v/v) Methanol	<u>Lösung A:</u>
10 mM Phosphatpuffer	10% (v/v) Essigsäure	2% (v/v) Ortho-Phosphorsäure
3 mM KCl		10% (w/v) Ammoniumsulfat
0.1 % (v/v) Tween-20	Coomassie Färbelösung	<u>Lösung B:</u>
pH 7.4	0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250	5% (w/v) Coomassie G-250
	45% (v/v) Methanol	<u>Mischung:</u>
<u>Blocksubstanz:</u> 5 % (w/v)	10% (v/v) Essigsäure	78% (v/v) Lösung A
Magermilchpulver, BSA		2% (v/v) Lösung B
oder Slimfast Schokolade		20% (v/v) Methanol
SDS Laufpuffer (10x)	SDS Trenngel (12%, 20 mL)	SDS Sammelgel (5%, 5mL)
2.5 M Glycin	6.60 mL H ₂ O	3.40 mL H ₂ O
250 mM Tris	8.00 mL Acrylamid (30%)	0.83 mL Acrylamid (30%)
35 mM SDS	5.00 mL Tris (1.5 M, pH 8.8)	0.63 mL Tris (1.0 M, pH 6.8)
	0.20 mL SDS (10%)	0.05 mL SDS (10% (w/v))
SDS Probenpuffer (5x)	0.20 mL Ammoniumpersulfat (10%)	0.05 mL APS (10% (w/v))
50% (v/v) Glycerol	0.008 mL TEMED	0.005 mL TEMED
250 mM Tris (pH 6.8)		
350 mM SDS		
500 mM DTE		
360 µM Bromphenolblau		
Transfer-Puffer:		
200 mM Glycin		
20 mM TRIS		
10% (v/v) MeOH		

10.3.1.4 Puffer und Lösungen- Proteomik

Lösung A: 0.1 % (v/v) Ameisensäure

Lösung B: 100 % (v/v) Acetonitril, 0.1 % (v/v) Ameisensäure

Alkylierungslösung: 55 mM Iodacetamid in 25 mM NH₄HCO₃

Verdau-Lösung: 0.01 µg/mL Trypsin in 25 mM NH₄HCO₃

Reduktionspuffer: 50 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃

Waschlösung 1: 25 mM NH₄HCO₃/Acetonitril (3:1)

Waschlösung 2: 25 mM NH₄HCO₃/Acetonitril (1:1)

LysC Reduktions-/ Denaturierungslösung: 8M Harnstoff in 50 mM Tris, pH 7.9

STAGE Elutionspuffer: 0.1 % (v/v) Ameisensäure, 80% (v/v) Acetonitril in H₂O

STAGE Equilibrierungspuffer: 0.1 % (v/v) Ameisensäure in H₂O

STAGE Reduktionspuffer: 0.05 M Iodacetamid in Harnstoff-Puffer [frisch]

STAGE Harnstoff-Puffer: 8 M Harnstoff in 0.1 M Tris HCl (pH 8.5), 5 µg/mL Trypsin [frisch]

Verdau immobilisierter Proben:**Reduktions-/ Denaturierungslösung:** 8M Harnstoff in 50 mM Tris, 1 mM DTT, pH 7.9**Alkylierungslösung:** 50 mM Chloroacetamid in Denaturierungs-/Reduktionslösung**Verdau-Lösung:** 1 µg/mL Trypsin in 50 mM Tris-Puffer pH7.5*10.3.1.5 Puffer und Lösungen – Mikroarray***SMI Assay Buffer:**

50 mM Tris-HCl pH 7.5

5 mM MgSO₄

0.1% Tween 20

1x Roti®Block (Carl Roth)

10.3.1.6 Puffer und Lösungen zur Extraktion lipidierter Sonden

4% SDS-Puffer (SB):	+HA-Puffer:	-HA-Puffer:
4% SDS	0.7 M Hydroxylamin-Linker	50 mM Tris
50 mM Tris	0.2 % Triton X-100	0.2 % Triton X-100
pH 7.4	pH 7.4	pH 7.4

10.3.2 Nährmedien

DMEM (Hoher Glucose Anteil) #P04-03550 PAN BioTech

DMEM/ F12 (1:1) für SILAC #88215 Thermo Scientific

DMEM/F12 (1:1) #P04-41250 PAN BioTech

Fetales Kälberserum (FBS) #10270 GIBCO-Invitrogen

L-Glutamin (200 mM) # P04-80100 PAN Biotech

MEM-NEAA (100x) #P08-32100 PAN BioTech

MEM (Earle's Salzen) # P04-09500 PAN BioTech

Penicillin- Streptomycin Lösung #P06-07100 PAN BioTech

PMA #P8139 Sigma Aldrich

Natrium Pyruvat #P04-43100 PAN BioTech

*10.3.2.1 Säugerzellen Kulturmedien***MEM mit Earle's Salzen,****L-Glutamin und 2.2 g/L NaHCO₃**Zusätze:

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM)

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

1 % (v/v) Natrium Pyruvat

DMEM mit 4.5 g/L GlucoseZusätze:

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

1 % (v/v) Natrium Pyruvat

1 % (v/v) MEM-NEAA

*10.3.2.2 Bakterielle Kulturmedien***LB-Medium**

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) Trypton

1 % (w/v) NaCl

LB Agar

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) Trypton

1 % (w/v) NaCl

1.5 % (w/v) Agar

10.3.3 Organismen

10.3.3.1 Säugerzelllinien

Zelllinie	Organismus	Organ	Morphologie	Medium
HEK293	Homo sapiens	Embr. Niere	Epithelia	DMEM + 10% (v/v) FBS
HeLa	Homo sapiens	Zervix	Epithelia	DMEM + 10% (v/v) FBS
Neuro-2a (N2a)	Mus musculus	Gehirn	Neuronal und amoeboid	MEM + 10% (v/v) FBS

Genauere Zusammensetzung der Medien, siehe Abschnitt Kulturmedien.

10.3.3.2 Bakterienstämme

OmniMAX™ 2 T1

F' (proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)) mcrA Δ (mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD

BL21-DE3

fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) *dcm+ ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔecoRI-B intlacI: PlacUV5:T7 gene1) i21 Δnin5

10.3.4 Enzyme

Trypsin rekombinant, Proteomics Grade #03708969001 Roche Diagnostics

Trypsin EDTA (1%) #P10-023100 PAN BioTech

Lys-C Protease, MS Grade #90051 Thermo Scientific

Pfu DNA Polymerase (rekombinant) # EP0501 Thermo Scientific

Restriktionsenzyme # verschiedene Fermentas

10.3.5 Protein- und DNA-Standards

Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (BioLabs®)

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas)

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BIO RAD)

10.3.6 Antikörper

10.3.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Organismus	Nummer	Hersteller
Anti-GFP	Maus	# G6795	Sigma Aldrich
Anti-DDK	Maus	# TA50011	OriGene Technologies
Anti-Tubulin	Maus	# F2168	Sigma Aldrich
Anti-FITC	Kaninchen	# 711900	Invitrogen™
Anti-FlagTag	Kaninchen	# 2368	CellSignaling Technology®
Anti-Bcl-xL	Kaninchen	# 2764	CellSignaling Technology®
Anti-mTOR	Kaninchen	# 2983	CellSignaling Technology®
Anti-mTOR	Maus	# 4517	CellSignaling Technology®
Anti-Aifm2	Kaninchen	# PA5-24562	Thermo Scientific
Anti-PPT1	Kaninchen	# WA-AP2538b	Biomol

Anti-Bcl-2	Kaninchen	# sc-492	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Bax	Kaninchen	# sc-526	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ergic1	Ziege	# sc-107206	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Oxa1L	Maus	# sc-365534	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rab7	Kaninchen	# D95F2	CellSignaling Technology®
Anti-CERT	Kaninchen	# PA5-28788	Invitrogen™
Anti-CLN3	Maus	# MABN372	MerckMillipore
Anti-CLN3	Maus	# WH0001201M3	Sigma Aldrich
Anti-CLN3	Maus	# sc-398192	Santa Cruz Biotechnology
Anti-panRas	Maus	# sc-166691	Santa Cruz Biotechnology
Anti-N-Ras	Kaninchen	# sc-519	Santa Cruz Biotechnology
Anti-LC3A/B	Kaninchen	# 4108	CellSignaling Technology®
Anti-Acid Ceramidase	Kaninchen	# 292176	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA	Ratte	# 11815016001	ROCHE
Anti-GST	Maus	# 71091	MerckMillipore
Anti-BUD31	Maus	# 374163	Santa Cruz Biotechnology
Anti-APP	Kaninchen	# A8717	Sigma Aldrich
Anti-His	Maus	# 23665	CellSignaling Technology®
Anti-Gal1	Maus	# 40103	CellSignaling Technology®
Anti-Gal3	Kaninchen	# 87985	CellSignaling Technology®

Einsatz und Verdünnungen nach Angabe des Herstellers.

10.3.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Reaktivität	Nummer	Hersteller
Esel-anti-Ziege HRP	Ziege	# sc-2033	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-Maus HRP	Maus	# 31430	Thermo Scientific
Ziege-anti-Kaninchen HRP	Kaninchen	# 31460	Thermo Scientific
Esel-anti-Ziege IR680	Ziege	# 926-68074	Li-Cor
Esel-anti-Ziege IR800	Ziege	# 926-32214	Li-Cor
Esel-anti-Maus IR680	Maus	# 926-68072	Li-Cor
Ziege-anti-Maus IR800	Maus	# 926-32210	Li-Cor
Esel-anti-Kaninchen IR680	Kaninchen	# 926-68073	Li-Cor
Esel-anti-Kaninchen IR800	Kaninchen	# 926-32213	Li-Cor
Ziege-anti-Ratte IR800	Ratte	# 926-32219	Li-Cor

Einsatz und Verdünnungen nach Angabe des Herstellers.

10.3.7 Reagenzsysteme und biologische Kits

Bradford Assay Farbstoffkonzentrat #500-0006 BIORad

Effectene Transfektionsreagent # 301425 Qiagen

FuGENE® 6 Transfektionsreagent #E2691 Promega

MycoAlert™ Mycoplasma Detektions Kit #LT07-318 Lonza

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix #F548S ThermoFisher Scientific

Pierce™ BCA™ Protein Assay # PI-23221 Thermo Fisher Scientific

Qiagen® Plasmid Mini Aufreinigungs Kit #12125 Qiagen
 QIAquick® Gel Extraktions Kit #28704 Qiagen
 QIAquick® PCR Aufreinigungs Kit #28104 Qiagen
 QuantiFast SYBR® Green PCR Kit # 204054 Qiagen
 QuantiTect Reverse Transkriptions Kit #205311 Qiagen
 Restore™ Western Blot Stripping Puffer #46428 ThermoFisher Scientific
 Rneasy Mini Kit #74104 Qiagen
 SuperSignal® West, Femto #34096 ThermoFisher Scientific
 SuperSignal® West, Pico #1859674 ThermoFisher Scientific
 Zell Proliferationsreagent WST-1 #11644807001 Roche
 ZellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay #G7571 Promgea

10.3.8 Sequenzierungen

Name	Sequenz
BGH-rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
CMV-F	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
M13 F (d-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 F (d-40)	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pcDNA3.1	CTA GAA GGC ACA GTC GAG GC
PCMV6-VP1.5	GGA CTT TCC AAA ATG TCG
PCMV6-XL39	TAG GAC AAG GCT GGT GGG
pEGFP-C1	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
pEGFP-N3	CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7 kurz	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG

10.3.9 Quantitative PCR

Ziel	Organismus	Orientierung	Sequenz
NRas	Human	FWD	GTT CCG GGG TCT CCA ACA TT
NRas	Human	REV	CAC CAG CAA GAA CCT CAA GC
NRas	Maus	FWD	CCA CTT TCA AGC TGC ACT GAC
NRas	Maus	REV	TTG TGC TGT GGA AGA ACC CA
CLN3	Maus	FWD	CAA AGG AGA TAT ACC
CLN3	Maus	REV	CTA GAC CAG TTT AAA

Alle Primer wurden mit Hilfe des NCBI Primer Design Programms generiert.
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

10.3.10 Plasmide

Name	Plasmid	Gen	Firma
eGFP-NRas	pEGFP-C1	NRas-Wt	Christine Nowak

HA-NRas	pCGN-HA	NRas-Wt	Christine Nowak
Cherry-CLN3	pOPIN(c)Cherry	CLN3	Prof. Dr. Stefan Raunser
Cherry-CLN3	pOPIN(n)Cherry	CLN3	Prof. Dr. Stefan Raunser
Flag mTOR	pCDNA3-Flag	mTOR	#26603 Addgene
HA-Bax	pCEP4-HA	Bax	#16587 Addgene
Bcl-xL	pCDH-puro	Bcl-xL	#46972 Addgene
LC3B	pOPIN(n)	LC3B	#DPF (Kampagne 93)
Cherry-CLN3-Neo	pOPIN(n)Cherry	CLN3	#DPF (Kampagne 104)
Aifm2	pOPIN(n)	Aifm2	#DPF (Kampagne 119)
Cherry(c)Aifm2	pOPIN(c)	Aifm2	#DPF (Kampagne 120)
nFlag-Aifm2	pTriEx4	Aifm2	#DPF (Kampagne 120)
eGFP-Bcl-xL	pOPIN(n)EGFP	Bcl-xL	#DPF (Kampagne 119)

10.3.11 Isolierte Proteine

Die Prinzipien der Klonierungstechnik, die in der DPF verwendet werden, sind eine Kombination von *in vivo*- und *SLICcloning* (Vogelstein Nuc Acid Res (1993), Elledge Nat Methods (2007)), die als SLIC-MIX Protokoll von F.Schulz und seinen Mitarbeitern eingeführt wurde.

Die jeweilige Nukleotidsequenz wurde amplifiziert und in pOPIN-NHis-3C subkloniert. Die Proteine wurden in *Escherichia coli BL21 (DE3)* nach Autoinduktion bei 25 ° C in Gegenwart von Ampicillin exprimiert und mittels Ni-Sepharose-Affinitätschromatographie gefolgt von Größenausschlusschromatographie gereinigt. SOS und Gal1 waren eine freundliche Gabe von Prof. H. Waldmann und Cherry-CLN3 wurde uns von Prof. S. Raunser zur Verfügung gestellt.

Name	Firma
Aifm2	#DPF (Kampagne 120)
Bcl-xL	#DPF (Kampagne 119)
Gal1	#Prof. H. Waldmann
SOS	#Prof. H. Waldmann
eGFP-NRas	#Christine Nowak
HA-NRas	#Christine Nowak
Cherry-CLN3	#Prof. Dr. Stefan Raunser

10.3.12 Programme und Software

Adobe Illustrator CC Version 11.0
Ape-A plasmid Editor Version 2.0.49
CellProfiler Version 2.0.0
CSS-Palm Version 4.0
EnsoChemLab Version 5.0.1
Fiji-ImageJ Version 2.0.0
GIMP Version 2.0
Image Studio™ Version 2.0
Image Quant TL Version 8.1
Inkscape Version 0.91
iQ5TM Optical Systems Software Version 2.0
KODAK MI Imaging Software Version 4.05

Maestro Version 10.5
MassLynx Version 4.1
MaxQuant Version 1.4.1.2
MestReNova Version 6.0.3-5604
NT Control Software Version 2.0.1.26
OriginPro Version 9.9
Prism Version 7.0
SnapGene Viewer Version 3.2.1
Tecan i-control Version 3.4.2.0
Xcalibur™ Version 4.0
ZEN lite Version 2.0

10.3.13 *Inhibitoren*

CAY10566, SCD1 Inhibitor (Biomol)
ML348 (Cravatt), APT Inhibitor (Comas)
ML349 (Cravatt), APT Inhibitor (Comas)

10.4 *Methoden*

10.4.1 *Isolierung der RNA*

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy mini Kits von QIAGEN isoliert. Dazu wurden im ersten Schritt Zellen in einer 12er Platte ausgesät und bei 37 °C für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und homogenisiert (*QIA-shredder*-Säulen). Das Lysat wurde 1:1 (v: v) mit 70 %-igem Ethanol vermischt und dieses Gemisch wurde in die *RNeasy*-Säulen überführt. Nach mehreren Waschschrritten und einem finalen Trocknen der Membran wurde die RNA mit 30 µL RNA-freien Wassers von der Säule eluiert.

10.4.2 *DNA/ RNA Konzentrationsbestimmung*

Alle Konzentrationsbestimmungen wurden mit Hilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm in Zweifachbestimmung durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 µL der Probe gemessen und der Leerwert der Lösung (Wasser oder Puffer) subtrahiert. Zusätzlich konnte die Reinheit der Proben durch Bildung des Verhältnisses von 260 nm zu 280 nm bestimmt werden.

10.4.3 *cDNA-Herstellung (Reverse Transkription)*

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* von QIAGEN in die cDNA umgeschrieben. Im Zuge des Kits wird eine virale-, reverse Transkriptase verwendet die durch ihre RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität in der Lage ist, cDNA aus der vorliegenden RNA zu synthetisieren. Diese DNA ist komplementär zur ursprünglichen RNA. Um sicherzustellen, dass keinerlei genomische DNA mehr vorhanden ist, wurde ein Gemisch (Gesamtvolumen 14 µL) aus 1 µg der isolierten RNA, 2 µL des gDNA *Wipeout* Puffers und DNA/ RNA-freiem Wasser hergestellt. Dieses Gemisch wurde bei 42 °C im PCR-Thermocycler für 2 Minuten inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Zu der Lösung wurden nun 6 µL eines Gemisches aus 1 µL der *Quantiscript reverse Transkriptase*, 4 µL des *Quantiscript* RT-Puffers und 1 µL der Oligonukleotid-Mischung zugegeben. Nach Inkubation bei 42 °C für 15 Minuten wurde die reverse Transkription durchgeführt und durch eine weitere Inkubation von 3 min bei 95 °C beendet.

10.4.4 *Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Mit Hilfe des *Thermocyclers* werden die zu vervielfältigende DNA, die freien Nukleotide sowie spezielle Primer mit der DNA-Polymerase zusammengebracht und sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung

und Elongation unterzogen. 10 µL des sogenannten *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mixes* wurden mit 100 ng der zu amplifizierenden DNA sowie 0.5 µM der jeweiligen Oligonukleotide gemischt und mit DNA-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die Schmelztemperaturen wurden an die Länge und den GC-Gehalt der jeweiligen Oligonukleotide angepasst.

PCR Zyklus:

Initiale Denaturierung: 98 °C für 10 s (1 Zyklus)

Weitere Denaturierungen: 98 °C für 1 s (30 Zyklen)

Anlagerung der Oligonukleotide: individuelle Schmelztemperatur für 5 s

Elongation der Oligonukleotide: 72 °C für 15 s

Finale Elongation: 72°C für 1 Minute.

10.4.5 Transformation in *E. Coli*-Zellen

100 µL der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (OneShot® OmniMAX™ 2 T1) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit 100 ng der zu transformierenden DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 Minuten bei 42 °C und einer erneuten Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden 900 µL LB-Medium zu dem Gemisch gegeben. Dieses Gemisch wurde eine Stunde im Schüttler bei 37 °C inkubiert, ab zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das sedimentierte Zellpellet wurde in 100 µL LB-Medium aufgenommen, auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck (Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

10.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. Coli*

Mit Hilfe des *EndoFree Plasmid Maxi Kits* wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des Prinzips der alkalischen Lyse aus transformierten OMNIMAX Zellen (Abschnitt 10.4.5) isoliert. Eine der unter Selektionsdruck gewachsenen Kolonien wurde gepickt und in eine flüssige Kultur überführt. Dazu wurde die Zellkolonie in 250 mL eines mit dem jeweiligen Selektionsmarker versetzten LB-Medium gegeben und bei 37 °C im Schüttler über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation der Flüssigkultur und anschließender Resuspension des Zellpellet konnte mit der Lyse begonnen werden. Im ersten Schritt wurde das Zelllysät neutralisiert und über ein Ionenaustauschharz (*QIAfilter Cartridge*) gegeben. Niedermolekulare Substanzen (RNA, Proteine) können durch Waschschriffe mittlerer Salzkonzentration entfernt werden, ohne die Bindung zwischen Plasmid-DNA und Säule zu gefährden. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration (QN-Puffer) kann dann die Plasmid-DNA eluiert werden. Nach Entsalzung (Isopropanol-Präzipitation), Waschschriffen (Endotoxin-freies 70 %iges Ethanol) und Aufkonzentration des Produktes (Lufttrocknung), wurde die Plasmid-DNA in 30 µL Endotoxin-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration (Abschnitt 10.4.2) bestimmt.

10.4.7 Glycerol-Kulturen

Um eine langfristige Konservierung von transformierter DNA zu gewährleisten, wurden Glycerol-Kulturen aller Bakterienkulturen hergestellt. Dazu wurden 500 µL der jeweiligen Bakterienkultur mit 500 µL sterilem Glycerol gemischt und bei – 80°C in Cryo-Gefäßen zur Langzeitlagerung eingefroren.

10.4.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte durch Agarosegele. Für die Herstellung der Gele wurden 2 % (w/v) Agarose in einfach konzentriertem TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Dann wurde GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain) zu der abgekühlten Mischung zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit jeweils 1/6 Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 130 V. Ein DNA-Standard diente als Massenkontrolle. Im Anschluss erfolgte die Sichtung der DNA und des DNA-Standards unter UV-Licht.

10.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von M. Bradford unter der Verwendung des Bradford-Reagenzes der Firma BIO-RAD bestimmt. Dazu wurde die Absorption der jeweiligen Proteinlösung (Lysate) bei 595 nm gemessen. Mittels Eichgerade gegen BSA wurde die Konzentration des sich in der Lösung befindenden Proteins berechnet.

10.4.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierten Bedingungen mit Hilfe von Polyacrylamidgelen. Die zu analysierenden Protein Proben wurden dazu in 5-fachem SDS-Probenpuffer für 7 Minuten bei 95 °C aufgekocht und auf 10 %- 12 %ige Trenngele aufgetragen. Als Kontrolle diente auch hier ein kommerziell erhältlicher Proteinstandard. Als Kathoden- und Anodenpuffer diente der einfach konzentrierte SDS-Laufpuffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V (40 mA pro Gel) für 45-60 Minuten. Nach der Gel-Elektrophorese wurden die Proteine mit einer Kolloidalen-Coomassie-Lösung gefärbt oder auf einer PVDF-Membran zur weiteren Untersuchung immobilisiert.

Für die proteomischen Analysen wurden kommerziell erhältliche Gradientengele (4-20%) der Firma Pierce (Gradient Protein Gel) oder BIORAD (Mini- PROTEAN®TGXTM Gels) verwendet.

10.4.11 Kolloidale-Coomassie Färbung

Für die Herstellung der Kolloidalen-Coomassie-Lösung wurden 400 mL einer Lösung aus 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure und 10 % (w/v) Ammoniumsulfat mit 10 mL einer Lösung aus 5 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau G-250 und 100 mL Methanol gemischt. Damit sich der negativ geladene Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagern kann, wurden die Proteine über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Um den Hintergrund zu minimieren und überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde eine Entfärbelösung aus 30 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure verwendet. Nach der Entfärbung wurden die Gele mit Wasser gewaschen und mit Hilfe des Gellologic 200 Imaging Systems (KODAK) und der KODAK-Mi Software analysiert oder für den In-Gel Verdau und/ oder zur proteomische Analyse mittels nano-HPLC/MS/MS weiterverarbeitet.

10.4.12 Immunoblot, Westernblott

Mit Hilfe des Immunoblots, oder auch Westernblots, lassen sich Proteine von Polyacrylamidgelen auf Membranen (PVDF-Membranen) transferieren und unter Anwendung spezifischer primärer und sekundärer Antikörper nachweisen. Um eine effektive Übertragung zu gewährleisten, wurde das jeweilige Gel, ebenso wie das Filterpapier (Wortmann Papier), in Transferpuffer gegeben und für einige Minuten inkubiert. Parallel wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und kurz in den Transferpuffer gelegt. Für den halbtrockenen Transfer in der horizontalen BIORAD Trans-Blotting-Kammer wurden die jeweilige feuchte PVDF-Membran auf zwei Lagen feuchtes Filterpapier gelegt, gefolgt vom Polyacrylamidgel und zwei weiteren Lagen feuchtem Filterpapier. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 Volt für 60 Minuten. Die Qualität des Transfers konnte anschließend mit der reversiblen Färbereagenz Ponceau S getestet werden. Dazu wurde die Membran in Ponceau S geschwenkt und mit Wasser entfärbt.

10.4.13 Proteindetektion mit LYCOR-gekoppelten Antikörpern

Um die immobilisierten Proteine der PVDF-Membran spezifisch identifizieren zu können, war es notwendig die noch möglichen freien Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Die Membran wurde dazu in 15 mL Magermilch-Blocklösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Um die transferierten Proteine spezifische nachweisen zu können, wurde der entsprechende Primärantikörper in 2 mL PBS-Puffer verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C unter schwenken inkubiert. Anschließend wurde dieser durch wiederholte Waschschriffe (jeweils 3-mal) der Membran mit PBS-T- und PBS-Puffer entfernt. Direkt danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in 2 mL PBS-Puffer verdünnt wurde, für

eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung mit Hilfe des LYCOR Systems.

10.4.14 *Affinitätschromatographie mit DBCO (Pull-down)*

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 90 %), geerntet und lysiert. Zur Modifikation der Dibenzocyclooctin-Agarose-Kügelchen (DBCO-Agarose, 9.38 μmol DBCO-Gruppen/ mL Agarose) wurden jeweils 500 μL der homogenisierten Kügelchen dreimal in 1 mL PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit jeweils 2 mM des Azid-Ceramids bzw. Palmitoylazids (500 μL) für 60 Minuten bei 4°C unter Drehung inkubiert. Die jeweilige Suspension wurde zentrifugiert (10 sec, 12.000x g) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach dreimaligen Waschschrritten mit PBS-Puffer wurden 100 μL dieser Agarose-Kügelchen mit jeweils 100 μL Zelllysat (2 mg/mL) bei 4°C über Nacht drehend inkubiert. Nach zweimaligen Waschschrritten mit Lyse-Puffer für 15 Minuten, wurden die Kügelchen mit ansteigenden Konzentrationen von Magnesiumchlorid haltigem Puffer gewaschen (25, 50, 75 mM). Um eine möglichst Tensid freie Massenanalyse zu gewährleisten, wurden die Agarose-Kügelchen erneut einem zweimaligen Waschschrtritt für 15 Minuten mit PBS-Puffer unterzogen. 10 μL des Gemisches wurden zur SDS-Gel und WB-Kontrolle nach Abschnitt 10.4.10 und 10.4.12 weiter geprüft.

10.4.15 *Affinitätschromatographie mit DBCO (Verdrängung)*

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 90 %), geerntet und lysiert. Das Zelllysat (2 mg/mL) wurde mit 50-800 μM der freien Ceramide (C16-Cer, C18-Cer or C24-Cer) bei 4 °C für 2 Stunden drehend inkubiert. Anschließend wurden die modifizierten Agarose-Kügelchen (Abschnitt 10.4.10) dazugegeben und das Gemisch bei 4°C über Nacht drehend inkubiert. Nach dreimaligen Waschschrritten mit PBS-Puffer wurden 10 μL des Gemisches zur SDS-Gel und WB-Kontrolle (Abschnitt 10.4.10 und 10.4.12) weiterverarbeitet.

10.4.16 *Tryptischer In-Gel-Verdau*

Für den tryptischen Verdau wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel beladen und aufgetrennt. Um die Proteine zu erkennen, wurde das Gel mit Kolloidalen-Coomassie gefärbt (Abschnitt 10.4.11) und anschließend mit Wasser entfärbt. Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten und in frische 1.5 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zerkleinerung dieser Gelstücke in 1-2 mm große Stücke wurden diese mit 200 μL der Waschlösung 1 für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 μL der Waschlösung 2 und einer Inkubation für weitere 15 Minuten bei 37 °. Um die Denaturierung der Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu ermöglichen, wurden 100 μL der Reduktionslösung hinzugegeben und das Gemisch für 45 Minuten bei 37 °C reduziert. Um die Alkylierung der Proteine zu gewährleisten, wurden 100 μL der Alkylierungslösung hinzugegeben und das Gemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 200 μL der Waschlösung 2 wurden 50 μL Acetonitril hinzugegeben. Nach der Trocknung der Proben für 15 Minuten wurde der Verdau durch die Zugabe von 50 μL der Trypsin-Verdauung eingeleitet. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 50 μL einer 25 mM NH_4HCO_3 Lösung dazugegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei 30°C geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils in 1.5 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 50 μL Acetonitril wurden die Gelstücke für 30 Minuten bei 0°C im Ultraschallbad beschallt und der jeweilige Überstand mit dem bisherigen vereint. Nach finaler Trocknung der Proben im Zentrifugalen Evaporator wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung und Messung in der nano-HPLC/MS/MS bei -80 °C gelagert.

10.4.17 *Tryptischer On-Bead-Verdau und Stage-Tip*

Für den tryptischen Verdau auf den Agarosen-Kügelchen wurden die Proben direkt weiter behandelt. Um die Denaturierung der Disulfidbrücken innerhalb der Proteine sowie eine Reduzierung insgesamt zu ermöglichen, wurden 50 μL der Denaturierungs-/Reduktionslösung hinzugegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei 37 °C unter schütteln (350rpm) inkubiert. Um die Alkylierung der Proteine zu gewährleisten, wurden anschließend 5 μL der Alkylierungslösung hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

geschüttelt. 5 pM BSA wurden zusätzlich zu den eigentlichen Proben mitbehandelt, um eine spätere Kontrolle des Verdau zu ermöglichen. Durch die Zugabe von 1 µg LysC wurde der Vorverdau der Proteine eingeleitet. Dazu wurde das Gemisch für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Kügelchen wurden mit 2.5 µL der Verdaulösung für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden vereinigt und nach der Zugabe von weiteren 2 µg Trypsin erfolgte der finale Verdau bei 37°C über Nacht. Durch Zugabe von 2 µL konz. TFA wurde der Verdau gestoppt.

Ausnahme:

Bei dem tryptischen Verdau des CLN3-Proteins wurde keine konz. TFA eingesetzt, um die Thioester-Bindung zwischen Protein und Palmitoyl nicht zu unterbrechen.

Die *Stage-Tip*-Aufreinigung ist eine vom Max-Planck-Institut für Biochemie in München entwickelte Methode zur Entsalzung und/ oder Vorfragmentierung der Peptidproben vor der proteomischen Massenanalyse. Dazu wurden die sogenannten *Stage-Tips* zuvor vorbereitet. Die hier mit 100 µL Methanol äquilibrierten *Stage-Tips* wurden mit einem C18-Kationenaustauschmaterial beladen. Um sie zu modifizieren, nutzt man eine spezielle Mini-Zentrifuge die die Aufnahme von bis zu 12 *Tips* erlaubt. Mit einer Drehzahl von 6200 U/Minuten können so 200 µL Puffer innerhalb von 2 Minuten durch die *Stage Tips* gewaschen werden. Nach der Aktivierung mit 100 µL Methanol wurden diese mit 100 µL Puffer B und zweimal 100 µL Puffer A gewaschen. Dann wurden die Proben (max. 200 µL pro Portion) auf die *Tips* aufgetragen. Die Proben werden erneut mit je 100 µL Puffer A gewaschen und anschließend mit 2 mal 20 mL Puffer B eluiert. Nach finaler Trocknung der Proben im Zentrifugalen Evaporator wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung und Messung in der nano-HPLC/MS/MS bei -80 °C gelagert.

10.4.18 Protein-Identifizierung mittels nano-HPLC/MS/MS

Die tryptischen Peptide wurden separiert und unter Verwendung eines Nano-HPLC/ MS/ MS analysiert. Die Trennungen wurden auf einem UltiMate™ 3000 RSLCnano-System (Dionex, Deutschland) durchgeführt. Die MS- und MS/ MS-Experimente wurden an einem Q-Exactive-Hybrid-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt, das mit einer Nanospray-Quelle (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Scientific) ausgestattet war. Alle verwendeten Lösungsmittel hatten LC-MS-Qualität. Die getrockneten tryptischen Peptide wurden in 20 µL einer 0.1 %igen TFA-Wasserlösung re-suspendiert und 10 µL der jeweiligen Mischung wurden in das Analysegerät (Abschnitt 10.1) injiziert. Die Experimente wurden in vier biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Datenauswertung wurde für jedes biologische Replikat getrennt unter Verwendung der MaxQuant-Software (v.1.5.2.8)^[244] einschließlich des Andromeda-Suchalgorithmus durchgeführt und das Maus-Referenzproteom der Uniprot-Datenbank zusammen mit der in MaxQuant enthaltenen Kontaminanten Datenbank durchsucht.

Die Suche wurde für die vollständige enzymatische Trypsinspaltungen durchgeführt, die zwei Missbildungen erlaubte. Für Proteinmodifikationen wurde die Carbamidomethylierung als fixe und die Oxidation von Methionin und Acetylierung des N-Terminus als variable Modifikationen gewählt. Die Massengenauigkeit für volle Massenspektren wurde auf 5 ppm und für MS/ MS-Spektren auf 20 ppm festgelegt. Die falschen Entdeckungsraten für die Peptid- und Proteinidentifizierung wurden auf 1% gesetzt. Zur weiteren Validierung wurden nur Proteine ausgewählt, für die mindestens zwei Peptide quantifiziert wurden. Proteine, die mit mindestens zwei *razor and unique* Peptiden in mindestens einem technischen Replikat nicht identifiziert wurden, wurden von der Suche der *Reverse*-Datenbank, die verwendet wurde, um die falsche Entdeckungsrate zu bestimmen, und bekannte Verunreinigungen, die der in MaxQuant enthaltenen Kontaminationsdatenbank entsprachen, aussortiert. Die relative Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem in MaxQuant implementierten markierungsfreien Quantifizierungsalgorithmus. Die markierungsfreie Quantifizierung (LFQ)-Intensitäten wurden logarithmiert (log₂), die aktiven Proben wurden zusammen gruppiert und die negativen Kontrollen ebenso. Proteine, die nicht in mindestens zwei technischen Replikaten in mindestens einer Gruppe quantifiziert wurden, wurden gelöscht. Danach wurden die Medianwerte des LFQ jedes Proteins pro Gruppe berechnet (wenn nur ein LFQ-Wert existiert wurde dieser als Median verwendet). Alle Proteine, die nur in der

aktiven Gruppe oder mit einer Differenz von mindestens zwei (eins im biologischen Experiment unter Verwendung von Azid anstelle von Palmitoylazid als Negativkontrolle) im Median der logarithmierten LFQ-Intensitäten quantifiziert wurden, wurden als potentieller Treffer eines einzelnen biologischen Replikats betrachtet. In einem abschließenden Schritt wurden die potenziellen Treffer aller 12 Replikate (vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten) zusammengenommen und Proteine, die in mindestens 8 der 12 Experimente potenzielle Treffer waren, mit den resultierenden Treffern aus dem Microarray-Assay kombiniert.

10.4.19 Immobilisierung auf dem Mikroarray

Der kommerziell erhältliche Mikroarray (ProtoArray®, Thermo Fisher Scientific) wurde für 20 Minuten von -20 °C auf 4 °C äquilibriert. Mit einer sterilen Pipette wurden die Kammern des Mikroarrays mit 5 mL SMI-Puffer gewaschen. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet die Oberfläche des Mikroarrays selbst nicht mit der Pipette zu berühren oder zu zerkratzen. Anschließend wurde der Array für 60 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler bei 50 rpm langsam mit der Waschlösung inkubiert. Um eine Austrocknung des Arrays zu verhindern, wurde dieser zuvor in eine sogenannte *Humidity-Chamber* überführt. Der Puffer wurde entfernt und überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem KIMTECH Präzisionstuch entfernt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Array nicht austrocknet. 600 µL des jeweiligen Azid-Ceramides (10 µM in SMI-Puffer) wurden tropfenweise auf den Mikroarray gegeben. Anschließend wurde der Array für 90 Minuten bei 4°C in der Kammer auf dem Schüttler bei 50 rpm langsam inkubiert. Nach Entfernung der Lösungen wurde der Array dreimal mit jeweils 5 mL SMI-Puffer für 5 Minuten gewaschen. Für die kupferfreie Klick-Reaktion wurden 5 mL einer DIFO-545 Lösung in SMI-Puffer (100 mmol) auf den Array gegeben. Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler (Lichtausschluss) wurde die Lösung entfernt und der Array erneut mit 5 mL SMI-Puffer gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde der Array dreimal in destilliertes Wasser getaucht um überschüssige Salze vollständig zu entfernen. Für die abschließende Trocknung des Mikroarrays wurde dieser in einem konischen Probenbehälter (50 mL) bei 200xg für 1 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Array wurde vor Licht geschützt und direkt gescannt (Abs/Em = 545/567nm). Die Daten wurden gegenüber dem Hintergrund normalisiert und nur Signale, die mindestens das doppelte oder mehr als der Hintergrund betragen, wurden als potentiell interagierende Kandidaten angesehen. Zwei zusätzliche Kriterien wurden verwendet, um eine signifikante Wechselwirkung zwischen einem Protein und einem Ceramid zu definieren: Z-Werte größer als 3.0 und einen Variationskoeffizienten von weniger als 50% (*Spot Duplikate*).

10.4.20 CETSA (Cellular Thermal Shift Assay)

Die Zellen wurden lysiert, die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und die Probe in zwei gleiche Teile von 1300 µL aufgeteilt. 13 µL einer 10 mM Stammlösung von C16-Cer in DMSO wurden zu 1300 µL des Zelllysates (8 mg/ mL) gegeben, was zu einer Endkonzentration von 100 µM C16-Cer (Compound C) und 1% DMSO führte. Analog wurden 13 µL DMSO (Vehicle V) zu 1300 µL des Zelllysates gegeben. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur vor inkubiert und in zehn gleiche Proben aufgeteilt. Die Proben wurden 5 Minuten auf die Zieltemperatur (Bereich: 42.0-63.40° C) erhitzt. Nach einer Abkühlphase von 5 Minuten (23°C) erfolgte die Zentrifugation aller Proben. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Anschluss gebロットet und analysiert. Die Daten wurden auf den Proteingehalt in den Proben normalisiert und mit GraphPad Prism® Software Version 5.0 (GraphPad) analysiert.

10.4.21 DSF

Der Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Assay wurde am RT-PCR-Gerät durchgeführt. DSF wurde durchgeführt, indem die Proben bei 25 °C für 5 Minuten äquilibriert wurden und dann die Temperatur auf 90 °C mit einer Geschwindigkeit von 2 °C/ Minute erhöht wurde. Die Datenpunkte wurden in Intervallen von 0.5 °C gesammelt. Die Datenauswertung für die Schmelztemperatur wurde unter Verwendung einer vorinstallierten Analysesoftware durchgeführt, die mit dem Instrument geliefert wurde. Optimale Konzentrationen des Proteins und des SYPRO-Orangen Farbstoffs wurden durch DSF-Messungen unterschiedlicher Konzentrationen von

Protein und SYPRO Orange in PBS Puffer bestimmt. Die optimalen Bedingungen waren 0.25 mg/ mL Protein in PBS-Puffer und 2X SYPRO-Orange (verdünnt von 5000X) innerhalb der Reaktionsplatte. In einer einzelnen Vertiefung der 96er PCR-Platte wurden 10 μ L der Proteinlösung (SYPRO-Orange in PBS-Puffer) und 10 μ L einer C16-Ceramid enthaltenden Lösung gemischt (200 – 0.2 μ M, verdünnt aus 10 mM DMSO mit SYPRO Orange in PBS Puffer) oder 2 % DMSO (v/v) in SYPRO Orange in PBS Puffer (als Vehikel Kontrolle). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Um die Dissoziationskonstante unter thermischer Denaturierung zu bestimmen, wurde die Konzentration des C16-Ceramids oder der Palmitinsäure gegen ΔT_m -Werte aufgetragen. Für die Anpassung der Daten wurde die Single-Site-Liganden-Bindungs-Gleichung verwendet. (Vivoli et al., 2014)

10.5 Zellbiologische Methoden

10.5.1 Kryokonservierung der Säugerzellen

Auftauen der Zellen

Vor dem eigentlichen Auftauen der Zellen wurde die Gewebekulturflasche (50 mL) mit 5 mL des jeweiligen Mediums unter sterilen Bedingungen befüllt. Die noch gefrorenen Zellsuspensionen (Flüssigstickstoff-Lagerung) wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in das Medium der vorbereiteten Zellkulturflasche pipettiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt.

Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in der Zellkulturflasche (75 cm²) gezüchtet. Nach Entfernung des Mediums und Waschschritten mit sterilem PBS Puffer (10 mL) wurden die Zellen mit 2 mL Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen (2-5 Minuten) inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in ihrem jeweiligen Medium (8 mL) aufgenommen und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung der Zellzahl (Abschnitt 10.5.2) wurde die Zellsuspension bei 800 rpm für 4 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 5%-igem DMSO-Medium re-suspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden dieses mit Hilfe der Einfrierhilfe (*Mrs Frosty*) 24 Stunden bei -80 °C gelagert um ein langsames Absinken der Temperatur von 1 °C/ Minuten zu gewährleisten. Die finale Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

10.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem automatischen Zellzähler Countess[®]. Der automatische Zähler verwendet dabei die Trypanblaufärbung in Kombination mit einem Autofokusmechanismus und Bildanalyse-Algorithmen, um eine Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen erstellen zu können. Um eine effektive Zählung zu gewährleisten, wurden 10 μ L der jeweiligen Zellsuspension mit 10 μ L Trypanblau gemischt und wiederum 10 μ L aus diesem Gemisch in eine kommerziell erhältliche Countess[®] Zählkammer überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte hierbei in einem Volumen von 0.4 μ L, was einem mm² in einem herkömmlichen Hämocytometer entspricht. Alle Bestimmungen erfolgten in 2-facher Messung unter Bildung des Mittelwertes.

10.5.3 Subkultivierung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in der Zellkulturflasche gezüchtet. Nach Entfernung des Mediums und Waschschritten mit sterilem PBS Puffer wurden 2 mL Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben, sodass alle Zellen kurzzeitig bedeckt waren, in den Brutschrank gestellt und bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen (2-5 Minuten) inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen in Medium aufgenommen, vereinzelt und letztendlich in der gewünschten Verdünnung wieder ausgesät und mit frischem Medium versorgt.

10.5.4 Stabile Transfektion von Zellen

Für die stabile Transfektion von Zellen wurde das Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] (Lonza) benutzt. Die Elektroporation ist eine Transfektionstechnik, die auf Basis der momentanen Erzeugung von kleinen Poren in der Zellmembran durch Anlegen eines elektrischen Impulses beruht. Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 90

%), geerntet und in ein 15 mL Kulturröhrchen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 3 mL der Zellsuspension bei 300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µL der Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit Lösungsgemisches (82 µL Nucleofector® Lösung und 18 µL Supplement Lösung 1) re-suspendiert. Direkt im Anschluss wurden 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA zugegeben und das Gemisch in die spezielle Amaxa Küvette überführt. Nach Auswahl des speziellen Transfektionprogrammes (HEK293: Q-001, N2a: T-024) wurde das Programm gestartet und die Transfektion vollzogen. Im Anschluss wurden 500 µL des jeweiligen Mediums zu dem Gemisch in der Küvette gegeben und in eine mit Medium präparierte Gewebekulturflasche pipettiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt und 2-3 Tage nach der Transfektion wurde mit dem jeweiligen Selektionsdruck begonnen, um eine stabile Transfektion und somit das Wachstum der gewünschten Zellen zu gewährleisten.

10.5.5 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung der Zelllysate wurden Zellen in Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen, mit PBS-Puffer gewaschen und trypsinisiert. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 10 mL eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen und erneut dreimal mit dem Puffer gewaschen. Dazu wurden die Zellen nach jedem Waschschritt für 7 Minuten bei 1200 rcf zentrifugiert. Die eigentliche Lyse erfolgte direkt im Anschluss. Dazu wurden die Zellen in dem Lysepuffer aufgenommen, zehnmal durch eine 20G Kanüle gepresst, per Ultraschall aufgeschlossen und direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Lysate erfolgte nach Bestimmung der Proteinkonzentration bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

10.5.6 Fixierung von Zellen

Zellen, die für (Immun-) Fluoreszenzfärbungen vorgesehen sind, wurden entweder in 96er (Schwarze Wand, klarer Boden, Corning), 384er (schwarze Wand, klarer Boden, Corning) oder in Standard 24er Platten auf Deckgläschen ausplattiert. Die Zellen wurden sorgfältig mit PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe des Fixierungspuffers (3.7% Formaldehyd in PBS) für 5-10 Minuten auf die Deckgläschen gebunden. Der Fixierungspuffer wurde durch Permeabilisierungspuffer (0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS) ersetzt und die fixierten Zellen wurden für weitere 5 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen um den restlichen Puffer zu entfernen.

10.5.7 Färbung von Zellen und Zellkompartimenten

Fluoreszierende Farbstoffe zur direkten Färbung von zellulären Kompartimenten und Strukturen wurden entsprechend der Herstellerangaben angewendet. Gewaschene Zellen wurden entweder direkt für die jeweilige Anwendung gefärbt oder wurden zuerst durch Fixierung und Permeabilisierung, falls erforderlich, auf die Färbung vorbereitet. Nach Vervollständigung der Färbung wurden die Zellen mit PBS für 5 Minuten unter leichtem Schütteln zur Entfernung der ungebundenen Farbstoffreste gewaschen. Die Kerne wurden durch das blaue DAPI (Invitrogen™) in lebenden Zellen sowie in fixierten Zellen (Stammlösung 1 mg/ mL in Ethanol, 1: 500 bis 1: 1000 in PBS, 1-2 h) gefärbt. Actin wurde durch den Einsatz von Alexa Fluor® 488 Phalloidin ebenfalls in fixierten und permeabilisierten Zellen eingesetzt (Invitrogen™, Stammlösung 300 U/ mL, 1: 500 in PBS). Mitochondrien wurden in lebenden Zellen durch die Inkubation mit 200 nM *MitoTracker™ Red* oder *MitoTracker™ Deep Red* (Stammlösung: 1 mM in DMSO) bei den gewünschten Testbedingungen für 45 Minuten gefärbt. Der Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt, bevor die Zellen schließlich fixiert, permeabilisiert und so für die Färbung weiterer Organellen genutzt werden konnten.

10.5.8 Färbung von Zellen mit Antikörpern

Fixierte Zellen (Abschnitt 10.5.6) wurden 1 Stunde lang blockiert (2% (v/v) BSA in PBS-T), um unspezifische Bindungen zu minimieren. Der primäre Antikörper wurde gemäß Herstelleranweisungen (üblicherweise PBS-T/2% (w/v) BSA, sofern nicht anders angegeben) verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben (alternativ bei 4 °C über Nacht). Der Antikörper wurde entfernt und zur Wiederverwendung bei -20 °C

gelagert. Die Zellen wurden 10 Minuten mit PBS-T/ 2% (w/v) BSA gewaschen. Der sekundäre Antikörper (fluoreszierendes Konjugat) wurde dann (1: 500 in PBS-T/ 2% BSA) zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für 10 Minuten entfernt. Die Zellen wurden fixiert und durch Eindämmung mit Nagellack für die lichtgeschützte Lagerung vorbereitet.

10.5.9 Befestigung von Zellen

Fluoreszenzgefärbte Zellen (Abschnitt 10.5.7 und 10.5.8) wurden dreimal für 5 Minuten mit PBS unter sachtem Schwenken gewaschen, um den verbleibenden Farbstoff zu entfernen. Wenn die Zellen in Platten ausgesät wurden, wurde pro Vertiefung ein ausreichendes Volumen an PBS gelassen, um die Zellen in einer flüssigen Lösung zu halten. Die Platten wurden mit Aluminium verschlossen und bei 4 °C bis zur finalen Mikroskopie gelagert. Die Deckgläschen mit den plattierten Zellen wurden vorsichtig entfernt und anschließend mit einem Tropfen Aqua-Poly/ Mount Medium (Polyscience) auf den Objektträger geklebt. Die Deckgläschen wurden bei Raumtemperatur lichtgeschützt getrocknet und anschließend bei 4 °C bis zur Mikroskopie gelagert.

10.6 Die Lipid-Extraktion (LE)

10.6.1 Vortest Cys-Pal Lipid-Extraktion

1.45 mg des Fmoc-geschützten, palmitoylierten Cystein-Bausteins (29) (Abschnitt 10.8) wurden in 500 µL DMSO gelöst und 5 µL dieser Lösung (5 mM, 25 nmol) wurden mit dem gleichen Volumen (5 µL) des Hydroxylamin-Linkers (50 - 3.75 pmol, 10 - 0.75 µM gelöst in 50 mM Tris, 0.2 % Triton X-100, pH 7.4) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 10 µL des Internen Standards C17:0 (0.5 nmol, Stammlösung 50 µM in Methanol) hinzugegeben. Die Proben wurden am Hochvakuum getrocknet, in 100 µL Methanol (LC-MS Grade) aufgenommen und jeweils 5 µL an der hochaufgelösten Masse analysiert.

10.6.2 Lipid-Extraktion aus Zelllysaten

Alle verwendeten Lösemittel hatten die LC-MS Reinheit. Die Zellen (typischerweise $1-4 \times 10^6$) wurden kultiviert, geerntet und in ein Kulturröhrchen überführt (Abschnitt 10.5.3). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Lysate hergestellt. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (500 µL) aufgenommen, fünf Hitze-/ Kälteschocks unterzogen, zehnmal durch eine 20G Kanüle gepresst und final durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Proteine wurden im Zuge dieses Extraktions-Protokolls mit einem Volumen eiskaltem Aceton (500 µL) gefällt und zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Das präzipitierte Proteinpellet wurde dreimal mit kaltem Methanol (500 µL) gewaschen. Um nicht-kovalent gebundene Lipide (Membranlipide) zu entfernen und deren Ausschluss aus den späteren Analysen zu gewährleisten, wurde die Chloroform-Methanol-Präzipitation (CM) von Drisdell und Green⁵⁷ auf diese Anwendung angepasst. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Jeweils 200 µL der Proteinlösung in Wasser (für die Probe und die Negativkontrolle) wurden mit zwei Volumen Methanol (400 µL), einem Volumen (200 µL) Chloroform und 1.5 Volumen destilliertem Wasser (300 µL) gemischt. Dazu wurde vor und nach Zugabe des jeweiligen Lösungsmittels die Suspension auf dem Vortexer® gemischt. Um die Phasen zu separieren, wurde das Gemisch bei 4.000x g für 20 Minuten in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Proteine präzipitierten dabei in der Interphase der Lösungsmittelphasen. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und nach Zugabe von 1.5 Volumen Methanol (300 µL) erneut zentrifugiert (4.000x g, 20 Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet zwei weiteren CM-Präzipitationen unterzogen.^{57,59,323} Nach der dritten und letzten Extraktion wurde nun das Pellet im Argonstrom vollständig getrocknet und in 4 SB-Puffer (4 % SDS, 50 mM Tris, pH 7.4) resuspendiert. Dazu wurden 200 µL des Puffers zu dem Rückstand gegeben und durch Schütteln (350 rpm, 37 °C, 10 Minuten) langsam gelöst. Nach einem finalen, kurzen Ultraschallstoß wurden die gebundenen Fettsäuren der Proteine durch Zugabe des +HA-Puffers (200 µL, 0.7 M Hydroxylamin-Linker, 0.2 % Triton X-100, pH 7.4) an den Hydroxylamin-Linker (Abschnitt 10.8) gebunden. Dazu wurde das Gemisch bei Raumtemperatur über Nacht

unter Drehung inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nun mit dem –HA-Puffer (200 µL, 50 mM Tris, 0.2 % Triton X-100, pH 7.4) über Nacht inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit dem internen C17-Standard (Abschnitt 10.8) versehen (10 µL, 0.5 nmol, 50 µM Stammlösung in Methanol) und am Hochvakuum getrocknet. Nach der finalen Resuspendierung in 100 µL Methanol erfolgte die Messung der Proben. Dazu wurden jeweils 5 µL in die hochaufgelöste Masse injiziert. Die Verdünnungen wurden bei der Quantifizierung der Proben mit einberechnet.

Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde auf einem LQT Orbitrap Fournier Transformations-Massenspektrometer von Thermo Electron durchgeführt. Dieses Spektrometer wurde an eine HPLC-Vorrichtung von der gleichen Firma gekoppelt. Die verwendeten Elutionsmittelgradienten betragen 0.1% v/v Ameisensäure in Wasser und 0.1% v/v Ameisensäure und Acetonitril. Der Ionisationsmodus war ESI (Elektronenspray-Ionisation) mit einer Quellenspannung von 3.8 kV. Für die Analyse verwendeten wir eine EC125/ 2 Nucleur C4 *gravity* Säule und injizierten 5 µL je zu analysierende Probe. Die Säule wurde bei 40 ° C unter Verwendung eines Säulenofens gehalten. Alle verwendeten Lösungsmittel hatten LC-MS Reinheit. Der Massenbereich von m/z 50 bis 800 wurde mit einer Auflösung von 60.000 für pro Scan durchgeführt. Die beiden mobilen Phasen waren Wasser + 0,1% HCO₂H (A) und Acetonitril + 0,1% HCO₂H (B) bei einer Flussrate von 500 µL/ Minuten. Ein linearer Gradient wurde programmiert: 0.0 Minuten: 90% A; 1.00 Minuten 90% A, 6.00 Minuten 25% A, 10.00 Minuten 10% A, 12.00 0% A. Die Quantifizierung erfolgte mit dem extrahierten Ionenchromatogramm jeder Verbindung. Der lineare Dynamikbereich wurde durch Injektion von Standardmischungen bestimmt. Die Positividentifizierung der Verbindungen beruhte auf der genauen Massenmessung mit einem Fehler von 5 ppm und ihrer LC-Retentionszeit im Vergleich zu einem Standard.

10.6.3 Inhibierung der Protein Acyl Transferasen (PATs)

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 85 %) und zur Inhibition der Protein Acyl Transferase mit einer finalen Konzentration von 50 µM 2-Bromopalmitatlösung für 30 Minuten inkubiert. Dazu wurde eine Stammlösung aus 50 mM 2-Bromopalmitat in DMSO hergestellt und diese 1:1000 im Medium verdünnt. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen.

10.6.4 Fütterung nicht-natürlicher Fettsäuren

Um eine Aufnahme und Acylierung nicht-natürlicher Fettsäuren in Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen zuerst kultiviert. Ab einer Konfluenz von 85 % wurden die Zellen mit einer finalen Konzentration von 400 µM der Fettsäure (C-19) für mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dazu wurde eine Fettsäure-Basislösung aus 78 µL der C-19 Fettsäure (12.5 mM in DMSO) und 4 Volumen (312 µL) einer Lösung aus 14 % (w/v) fettsäurefreier BSA in 0.1 M Tris-Puffer (pH 8.3) hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Lösung steril filtriert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Fettsäure-Basislösung (2.5 mM) bei 4 °C gelagert. Diese Stammlösung wurde 1:6.25 im Medium verdünnt. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, lysiert und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen.

10.6.5 Immunopräzipitation

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 90 %), geerntet und lysiert. Zur Modifikation der Protein A/G-Agarose-Kügelchen (ThermoFisher Scientific Pierce, 7 mg humanes IgG/mL Harz) wurden 100 µL dreimal in 500 µL PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit jeweils 5 µL des jeweiligen primären Antikörpers bei 4°C unter Drehung über Nacht inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS-Puffer wurden 200 µL des Lysates (1–4 × 10⁶) zu jeweils 50 µL der Antikörper-Agarose-Kügelchen hinzugegeben und die Mischung bei 4 °C für 2 Stunden drehend inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (10 sec, 12.000x g) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach dreimaligen Waschschritten mit PBS-Puffer und einem finalen Zentrifugationsschritt (10 sec, 12.000x g) wurde der Überstand entfernt, das resultierende Pellet wurde in 150

μL 4 SB-Puffer gelöst und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen. 10 μL des Gemisches wurden zur SDS-Gel und WB-Kontrolle (Abschnitt 10.4.10 und 10.4.12) weiterbearbeitet.

10.6.6 Inhibierung der Acyl Protein Thioesterasen (APTs)

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 85 %) und anschließend zur Inhibition der Acyl Protein Thioesterasen mit einer finalen Konzentration von 30 μM des Inhibitors (ML348 oder ML349) über 1 Stunde inkubiert. Dazu wurde eine Stammlösung aus 30 mM ML348 oder ML349 in DMSO hergestellt und diese 1:1000 im Medium verdünnt. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen.

10.6.7 Inhibierung der Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1)

Die Zellen wurden kultiviert (Konfluenz von 85 %) und anschließend zur Inhibition der Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) mit einer finalen Konzentration von 5 μM des Inhibitors CAY10566 über 48 h inkubiert. Dazu wurde eine Stammlösung aus 5 mM des Inhibitors in DMSO hergestellt und diese 1:1000 im Medium verdünnt. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen wie geerntet und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen.

10.6.8 C^{13} Experimente mit Palmitoylsäure-1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$

Um eine Aufnahme und Acylierung nicht-natürlicher Fettsäuren in Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen kultiviert und ab einer Konfluenz von 85 % wurden die Zellen mit einer finalen Konzentration von 400 μM der Fettsäure (1,2,3,4- ^{13}C -markierten Palmitoylsäure) für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Dazu wurde eine Fettsäure-Basislösung aus 78 μL der 1,2,3,4- ^{13}C -markierten Palmitoylsäure (12.5 mM in DMSO) und 4 Volumen (312 μL) einer Lösung aus 14 % (w/v) fettsäurefreier BSA in 0.1 M Tris-Puffer (pH 8.3) hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Lösung steril filtriert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Fettsäure-Basislösung (2.5 mM) bei 4 °C gelagert. Diese Stammlösung wurde 1:6.25 im Medium verdünnt. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, lysiert und dem Lipid-Extraktions Protokoll (Abschnitt 10.6.2) unterzogen. Nicht behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen wie immer geerntet und dem Lipid-Extraktions Protokoll (siehe Abschnitt 10.6.2) unterzogen.

10.7 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptidsynthese und die Proteinligation

10.7.1 Beladung des 2-Chlorotrylchlorid-Harzes

3 g 2-Chlorotrylchlorid-Harz (2.10 mmol, Beladung: 0.7 mmol/g) wurden in einem Festphasenreaktor (Rosenbaumreaktor) über Nacht im Hochvakuum getrocknet. 3.78 g Fmoc-Cys(Far)-OH (0.01 mol, 3.3 eq) wurden ebenfalls über Nacht getrocknet. Die feste Phase wurde mit frisch destilliertem CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur 30 Minuten lang unter Schutzgas geschwenkt. Der Fmoc-geschützte Baustein wurde in frisch destilliertem CH_2Cl_2 gelöst und zusammen mit 2.61 mL trockenem DIPEA (13.86 mmol, 6.6 eq) zu dem gequollenen Harz hinzugefügt und 3 Stunden geschüttelt. Im Anschluss an die Kupplung wurde das Harz dreimal mit destilliertem CH_2Cl_2 , dreimal mit einer Lösung aus CH_2Cl_2 /Methanol/DIPEA (17:2:1) und dreimal mit CH_2Cl_2 (5 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Harz im Hochvakuum getrocknet und die Beladung des Harzes mittels UV-Spektroskopie (Abschnitt 10.7.2) bestimmt.

10.7.2 Bestimmung der Harzbeladung

1-2 mg des zu bestimmenden Harzes wurden mit 10 mL eines Gemisches aus Piperidin und DMF (1:4) versetzt und für 20 Minuten geschüttelt. Nach einer Ruhezeit von 10 Minuten wurde 1 mL der Lösung entnommen und die UV-Absorption bei 301 nm bestimmt. 1 mL der reinen Piperidin/DMF (1:4)-Lösung wurden dabei als Nullprobe verwendet. Der Beladungsgrad des Harzes lässt sich anschließend mit Hilfe des Lambert-Berrschen Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

10.7.3 Testabspaltung vom 2-Chlorotritylharz

5-10 mg des beladenen Harzes wurden mit einer Abspaltungslösung aus Trifluoressigsäure, Triethylsilan und CH_2Cl_2 (1:4:95) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Kupplungen des Lipopetids an der festen Phase zu überprüfen. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert.

10.7.4 Abspaltung vom 2-Chlorotritylharz

Um das am 2-Chlorotritylharz immobilisierte Peptid abzuspalten, wurde dieses in einen Spritzenreaktor überführt und dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Anschließend wurde die Abspaltungslösung aus Trifluoressigsäure, Triethylsilan und CH_2Cl_2 (1:4:95) zu dem im Reaktor befindlichen Harz gegeben und diese 30 Minuten in dieser Lösung geschüttelt. Nach insgesamt dreimaligem Abspalten des Peptides wurde die feste Phase dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen, die gesammelten Lösungen mehrmals mit Toluol co-evaporiert und anschließend in einer minimalen Menge Methanol gelöst und in kaltem Et_2O präzipitiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden mittels analytischer LC-MS untersucht und mit einer präparativen HP-LC gereinigt. Die vereinigten Produkt Fraktionen wurden nochmals lyophilisiert. Die Aufreinigung der Lipopeptide erfolgte durch präparative HPLC-MS.

10.7.5 Markierung von N-Ras ($\Delta 1-181$) Wt

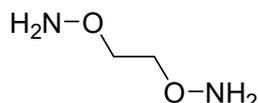
Das in Bakterien exprimierte, verkürzte N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$) wurde in 100 mM NaHCO_3 Puffer (pH 8.5) überführt und mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford) wurden 10 mg des Protein in 100 mM NaHCO_3 Puffer (pH 8.5) und 1 mg des Cy3-NHS Esters (GE Healthcare) unter Lichtausschluss und unter Schutzgas bei 4 °C langsam gedreht. Nach 2 Stunden wurde das Protein über Größenausschlusschromatographie von dem freien Farbstoff getrennt und in den Ligationspuffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , pH 7.5) mit Hilfe von Microcons (0.5 mL, MWCO 10 kDa) umgepuffert. Sowohl die Protein- als auch die Farbstoffkonzentration wurde durch Messungen der jeweiligen Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bzw. 552 nm ($\epsilon = 150000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

10.7.6 Ligation N-terminaler, lipidierter Peptide

2 eq des doppelt lipidierten Peptids wurden in 300 μL Methanol gelöst und mit 11 % Triton X-114 (1 mL) und 1 eq des verkürzten N-Ras-Proteins ($\Delta 1-181$ Wt) vermischt. Unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss, wurde dieses Gemisch bei 4 °C über Nacht auf einem Rotationsmischer gedreht. Anschließend wurden 12 mL Puffer hinzugegeben und der Reaktionsansatz bei 37 °C im Wasserbad weiter inkubiert. Um die Tritonphase vom Puffer abzutrennen, wurde das Ligationsgemisch bei 30 °C für 5 Minuten zentrifugiert (4000 rpm). Dieser Vorgang wurde zweimal durch die Zugabe von jeweils 1 mL Triton X-114 wiederholt. Die gesammelten Tritonphasen wurden daraufhin mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie gereinigt und in Amicons (MWCO 10 kDa) aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration konnte weiter durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt werden. Die weitere Analyse und Charakterisierung der ligierten Lipoproteine erfolgte mittels SDS-Page (12 %-iges Gel) und MALDI-TOF. Die Proteine wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

10.8 Synthese der Verbindungen zur Untersuchung von Lipidmustern S-acylierter Proteine

O,O'-(Ethan-1,2-diyl)bis(hydroxylamin) (Dioxyamin)(1)



Eine Lösung aus 18.93 g *N*-Hydroxyphthalimid (0.12 mol, 2 eq), 5 mL 1,2-Dibromethan (0.06 mol, 1 eq) und 8.04 mL Triethylamin (0.06 mol, 1 eq) in DMF wurde bei 65°C 5 Stunden erhitzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde in Essigsäure (40 mL) und 48 %-iger Bromwasserstoffsäure (60 mL) 1.5 Stunden bei 120 °C gekocht. Nach Filtration der erkalteten Lösung wurde das Filtrat evaporiert und der Rückstand mit Chloroform (5-mal) gewaschen. Nach Umkristallisation (Methanol-Chloroform) konnte das Dioxyamin erhalten werden.

Ausbeute: 54.76 g (0.03 mol, 92 %);

R_f-Wert: 0.30 MeOH/CH₂Cl₂ (1:20);

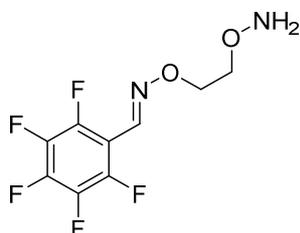
HPLC-MS: m/z berechnet für C₂H₈N₂O₂: 93.06 [M+H]⁺, gefunden 92.96 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂H₈N₂O₂: 93.0659, gefunden 93.0654 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 4.23 (s, 4H);

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 72.1.

(E)-2,3,4,5,6-Pentafluorobenzaldehyd O-(2-(aminooxy) ethyl) oxim (2)



1.34 g Dioxyamin (14.58 mmol, 4.5 eq) wurden in 12 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 277.92 µL Essigsäure (4.86 mmol, 1.5 eq) und 1.19 g wasserfreiem MgSO₄ (9.72 mmol, 3eq) wurden 400 µL Pentafluorobenzaldehyd (3.24 mmol, 1 eq) langsam hinzugegeben. Das Gemisch wurde 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und evaporiert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (EA/PE (1:9)) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.51 g (1.86 mmol, 58 %);

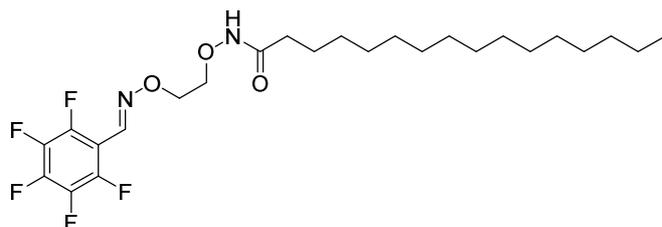
R_f-Wert: 0.52 EA/PE (1:9);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₉H₇F₅N₂O₂: 271.05 [M+H]⁺, gefunden 270.95 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₉H₇F₅N₂O₂: 271.0501, gefunden 271.0500 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.29 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.40 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.19 (t, J = 6.9 Hz, 2H);

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 144.6, 138.7, 72.8, 72.6.

(E)-N-(2-(((perfluorophenyl)methylen) amino) oxy) ethoxy) palmitamid (3)

Zu 150 mg einer Lösung des Linkers (2) (0.56 mmol, 1 eq) und 115.44 μL Triethylamin (0.83 mmol, 1.5 eq) in 4 mL CH_2Cl_2 wurden 168.5 μL Palmitoylchlorid (0.56 mmol, 1 eq) zugegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C gerührt und röhrend langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0.16 g (0.31 mmol, 57 %);

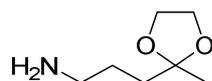
R_f -Wert: 0.14 EA/PE (1:4);

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_3$: 509.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 509.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_3$: 509.2797, gefunden 509.2788 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 10.98 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 4.35 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 1.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 2), 1.23 (m, 24H), 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H);

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ 144.6, 138.3, 73.1, 72.4, 32.1, 31.2, 28.9, 28.8, 28.6, 24.8, 22.1, 13.8.

5-Amino-2-Pentanon ethylen ketal (4)

35 g Phthalimid (0.24 mol, 1 eq) wurden in 250 mL Ethanol gelöst und 30 Minuten gekocht. 26.69 g Kaliumhydroxid (0.48 mol, 2 eq) wurden in einem Gemisch aus 15 mL Wasser und 46 mL Ethanol gelöst und 30 mL von diesem Gemisch wurden zu der noch kochenden Phthalimid-Lösung hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde zügig auf Raumtemperatur gekühlt und das Präzipitat abfiltriert. Die zweite Portion der KOH-Lösung wurde zu dem Filtrat gegeben und das Präzipitat wurde erneut abfiltriert. Die Kalium-Phthalimid Kristalle wurden mit Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. 6.77 g Kalium-Phthalimid (0.04 mol, 1 eq) wurden zu einer Lösung aus 5.5 mL 5-Chlor-2-Pentanone Ethylen Ketal (0.04 mol, 1 eq) in DMF (50 mL) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht refluxiert und das Lösemittel evaporiert. Nach Zugabe von Chloroform wurde das Gemisch mit Wasser gewaschen (3-mal) und die separierte wässrige Phase wurde erneut mit Chloroform extrahiert (2-mal). Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO_4 getrocknet. Der Feststoff wurde in Ethanol aufgenommen und 1.16 mL Hydrazin (0.04 mol, 1 eq) wurden hinzugegeben. Das Gemisch wurde 3 Stunden refluxiert, das Lösemittel evaporiert, in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 4.86 g (0.03 mol, 92 %);

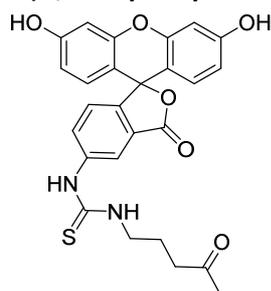
R_f -Wert: 0.26 MeOH/ CH_2Cl_2 (1:9);

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2$: 146.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 145.99 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2$: 146.1176, gefunden 146.1171 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 3.92 (m, 4H), 2.92 (m, 2H), 1.73 (m, 4H), 1.28 (s, 3H);

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ 65.6, 41.1, 36.7, 23.9.

1-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)-3-(4-oxopentyl)-harnstoff (5)

Zu einer Lösung aus 0.8 g Fluoresceineisothiocyanat (2.04 mmol, 1 eq) und 0.89 g 5-amino-2-pentanone ethylen ketal (4) (6.13 mmol, 3 eq) in trockenem DMF wurden 0.85 g PyBOP (1.64 mmol, 0.8 eq) und 0.76 mL Triethylamin (5.52 mmol, 2.7 eq) hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Rohprodukt wurde in Ethylacetat aufgenommen, mit 1 M HCl (3-mal) und im Anschluss mit gesättigter NaCl-Lösung (3-mal) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt mit 10 mL eines Gemisches aus TFA/CH₂Cl₂/H₂O (2:7.5:0.5) bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt (Entschützung). Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde säulenchromatographisch (MeOH/CH₂Cl₂ (1:49)) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.96 g (1.95 mmol, 96 %);

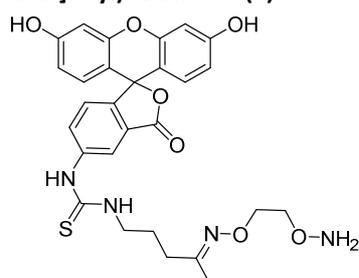
R_f-Wert: 0.27 MeOH/CH₂Cl₂ (1:9);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₆H₂₂N₂O₆S: 491.13 [M+H]⁺, gefunden 491.06 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂₆H₂₂N₂O₆S: 491.1271, gefunden 491.1268 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.20 (dd, *J* = 5.8, 3.4 Hz, 1H), 7.94 – 7.86 (m, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (m, 2H), 4.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.28 (s, 3H);

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ 207.5, 179.4, 168.2, 154.5, 154.3, 152.6, 152.4, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 41.9, 29.7, 24.3.

(E)-1-(4-((2-(aminooxy)ethoxy)imino)pentyl)-3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)-Harnstoff (6)

63.2 mg Fluoresceinisothiocyanat -Aminoketon (0.13 mmol, 1 eq) wurden in 0.16 mL Methanol gelöst und tropfenweise zu 47.46 mg Dioxyamine (1) (0.52 mmol, 4 eq), in 400 µL Methanol gelöst, gegeben. Die Reaktion wurde 5 Stunden auf Eis gerührt. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (0.07 mol, 55 %);

R_f-Wert: 0.38 MeOH/CH₂Cl₂ (1.5:8.5);

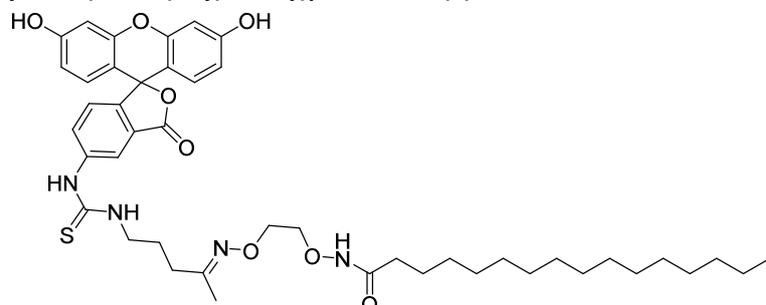
HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₈H₂₈N₄O₇S: 565.18 [M+H]⁺, gefunden 565.10 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂₈H₂₈N₄O₇S: 565.1752, gefunden 565.1760 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.51 (s, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.10 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 2H), 4.13 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.84 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 1.28 (s, 3H);

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ 207.5, 179.4, 164.3, 154.5, 154.3, 152.6, 152.4, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 73.6, 69.4, 47.1, 41.9, 29.7, 24.3.

(E)-N-(2-(((5-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thio-ureido)pentan-2-ylidene)amino)oxy)ethoxy)palmitamid (7)



Zu einer Lösung aus 44 mg Hydroxylamin-Linker (6) (0.08 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 16 μL Triethylamin (0.12 mmol, 1.5 eq) und 23.64 μL Palmitoylchlorid (0.08 mmol, 1 eq) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 0°C gerührt und langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

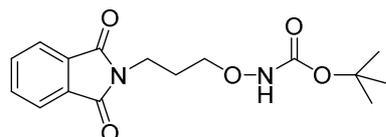
Ausbeute: 66.60 mg (20.67 μmol , 27 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$: 803.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 803.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$: 803.4048, gefunden 803.4053 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.51 (s, 1H), 8.04 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.13 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.84 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 2.51 (t, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.23 (m, 24H), 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ 207.5, 179.4, 167.2, 164.3, 154.5, 154.3, 152.6, 152.4, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 73.6, 69.4, 47.1, 41.9, 33.1, 31.7, 29.7, 29.3, 29.1, 28.8, 28.6, 25.3, 24.3, 22.5, 13.9.

Tert-butyl (3-(1, 3-dioxoisindolin-2-yl) propoxy) carbamat (8)



10 g *N*-(3-bromopropyl)-phthalimid (37.3 mmol, 1 eq) und 9.93 g *N*-Boc hydroxylamine (74.6 mmol, 2 eq) wurden in CH_2Cl_2 gelöst. Das Gemisch wurde auf 0°C gekühlt und 22.26 mL Diazabicycloundecen (149.19 mmol, 4 eq) wurden tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktion wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit 1 M HCl (2-mal) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter niedrigem Druck konzentriert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (EA/ CH_2Cl_2 (1:9)) aufgereinigt.

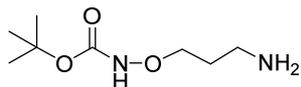
Ausbeute: 7.56 g (23.60 mmol, 64 %);

R_f -Wert: 0.63 MeOH/EA (9:1);

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$: 321.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 321.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$: 321.14450, gefunden 321.14465 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.91 - 7.70 (m, 4H), 7.27 (s, 1H), 3.73 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.85 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.38 (s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 167.7, 156.1, 134.2, 131.6, 122.8, 79.5, 72.9, 34.7, 27.9, 26.7.

tert-butyl (3-aminopropoxy) carbamat (9)

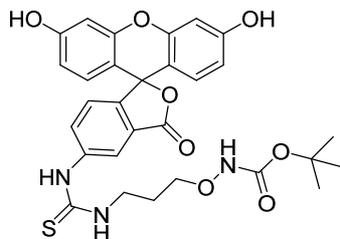
7.56 g *N*-(3-*tert*-butyl-*N*-propoxycarbamat) phthalimid (8) (0.023 mol, 1 eq) wurden in Methanol gelöst, 2.99 mL Hydrazin (0.09 mol, 4 eq) wurden tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde evaporiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Das weiße Präzipitat wurde abfiltriert und das Filtrat aufkonzentriert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (MeOH/CH₂Cl₂ (1:9)) aufgereinigt.

Ausbeute: 4.39 g (0.02 mol, 97 %);

HPLC-MS: *m/z* berechnet für C₈H₁₈N₂O₃: 191.13 [M+H]⁺, gefunden 190.87 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: *m/z* berechnet für C₈H₁₈N₂O₃: 191.13902, gefunden 191.13903 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.31 (s, 1H), 3.75 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.61 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.1, 79.3, 73.3, 30.9, 28.0, 27.9.

tert-butyl-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen] -5-yl) thio-ureido) propoxy) - carbamat (10)

0.87 mL DIPEA (5.14 mmol, 4 eq) wurden zu einer Lösung aus 0.61 g tert-butyl (3-aminopropoxy)-carbamate (9) (3.21 mmol, 2.5 eq) und 0.5 g Fluoresceineisothiocyanat (1.28 mmol, 1 eq) in trockenem DMF zugegeben. Das Gemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (MeOH/CH₂Cl₂ (1:9)) aufgereinigt.

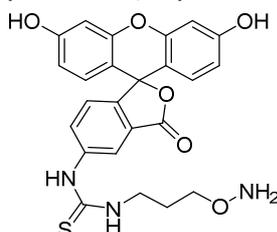
Ausbeute: 0.73 g (1.26 mmol, 98 %);

R_f-Wert: 0.79 MeOH/CH₂Cl₂ (1:9);

HPLC-MS: *m/z* berechnet für C₂₉H₂₉N₃O₈S: 580.16 [M+H]⁺, gefunden 580.02 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: *m/z* berechnet für C₂₉H₂₉N₃O₈S: 580.17481, gefunden 580.17654 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.39 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 179.4, 168.2, 158.3, 154.5, 154.3, 152.6, 152.4, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 85.1, 83.2, 47.1, 41.9, 29.4, 25.3.

1-(3-(aminooxy) propyl) -3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen] -5-yl) thio-Harnstoff (FITC-Linker; 11)

0.73 g der Verbindung (10) (1.26 mmol, 1 eq) wurden in einem Gemisch aus TFA/ CH₂Cl₂ (1:1) 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0.59 g (1.24 mmol, 98 %);

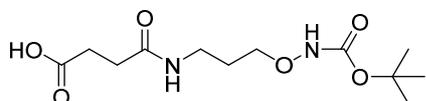
R_f-Wert: 0.22 MeOH/CH₂Cl₂ (1:9);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₄H₂₁N₃O₆S: 480.12 [M+H]⁺, gefunden 480.00 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂₄H₂₁N₃O₆S: 480.12238, gefunden 480.12276 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 2H), 4.03 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 179.4, 168.2, 154.5, 154.3, 152.6, 152.4, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 41.9, 25.3.

2,2-dimethyl-4,11-dioxo-3,6-dioxa-5,10-diazatetradecan-14-oic säure (12)



1.05 g Bernsteinsäureanhydrid (0.01 mol, 1 eq) wurden in Acetonitril gelöst und tropfenweise zu einer Lösung aus 2 g tert-butyl (3-aminopropoxy) carbamat (9) (0.01 mol, 1 eq) gegeben. Das Gemisch wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Evaporation des Lösungsmittels konnte das Produkt isoliert werden.

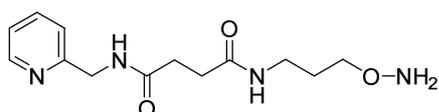
Ausbeute: 2.92 g (0.010 mol, 95 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₂H₂₂N₂O₆: 291.14 [M+H]⁺, gefunden 290.84 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₂H₂₂N₂O₆: 291.15506, gefunden 291.15479 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.73 (dd, J = 12.7, 6.7 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.53 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 173.8, 172.3, 156.1, 85.2, 79.3, 73.3, 30.9, 28.0, 29.3, 27.9.

N1-(3-(aminooxy)propyl)-N4-(pyridin-2-ylmethyl) succinamid (13)



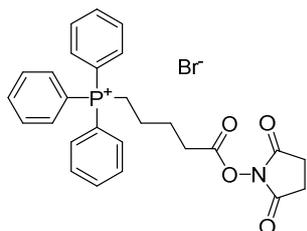
4 g der Verbindung (12) (0.014 mol, 1eq) wurden in DMF gelöst und 5.7 g HCTU (0.014 mol, 1 eq), 4.8 mL DIPEA (0.027 mol, 2 eq), sowie 1.42 mL 2-Picolylamin (0.014 mol, 1 eq) wurden hinzugegeben: Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das getrocknete Rohprodukt wurde mit einem Gemisch aus TFA/DCM (1:1) für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach Evaporation des Lösemittels wurde das Produkt säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/ MeOH/ Et₃N (98:1:1)) aufgereinigt.

Ausbeute: 3.1 g (0.011 mol, 81 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₃H₂₀N₄O₃: 281.15 [M+H]⁺, gefunden 281.06 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₃H₂₀N₄O₃: 281.16082, gefunden 281.16098 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.51 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 10.2, 5.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 18.6, 10.0 Hz, 2H), 4.39-4.45 (m, 2H), 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.73 (dd, J = 12.7, 6.7 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.53 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 173.8, 172.3, 156.3, 148.2, 140.1, 125.1, 120.8, 79.3, 73.3, 30.9, 28.0, 27.9.

(5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-5-oxopentyl)triphenylphosphonium (14)

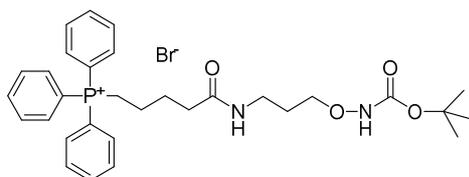
15.2 mL Dicyclohexylcarbodiimid (69.93 mmol, 1 eq) wurden zusammen mit 8.04 g *N*-Hydroxysuccinimid (69.93 mmol, 1 eq) zu einer Lösung aus 250 mL Acetonitril und 31 g (4-carboxybutyl) triphenylphosphin bromid (69.93 mmol, 1 eq) gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend konnte das Präzipitat abfiltriert werden. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck konzentriert und mit Ether (2-mal) gewaschen. Nach erneuter Evaporation des Lösungsmittels konnte das Produkt erhalten werden. Vgl.¹²⁸

Ausbeute: 31.26 g (67.89 mmol, 97 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{27}H_{27}NO_4P$: 460.167 [M]⁺, gefunden 460.164 [M]⁺;

HR-MS für [M]⁺: m/z berechnet für $C_{27}H_{27}NO_4P$: 460.16722, gefunden 460.16718 [M]⁺;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7.80 (m, 15H), 3.99 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 2.23 (s, 2H), 1.83 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 167.3, 165.4, 133.2, 129.4, 129.3, 116.8, 29.9, 27.5, 24.9, 22.1, 20.8.

(2,2-dimethyl-4,11-dioxo-3,6-dioxa-5,10-diazapentadecan-15-yl)-triphenylphosphonium (15)

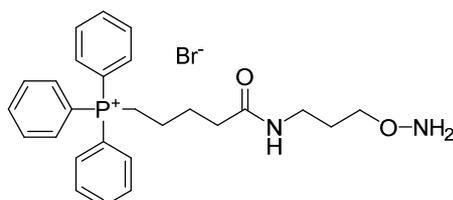
5 g der Vorstufe (14) (10.86 mmol, 1eq) wurden in Acetonitril und 100 mM Borat-Puffer (pH 9.5) (1:2) gelöst und zu einer Lösung aus Verbindung (12) (2.06 g, 10.86 mmol, 1 eq) in Acetonitril gegeben. Das Gemisch wurde 20 Minuten bei 40 °C erhitzt und anschließend wurde eine Lösung aus Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (74.9:25:0.1) hinzugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Vgl.¹²⁸

Ausbeute: 5.58 g (10.43 mmol, 96 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{31}H_{40}N_2O_4P$: 535.27 [M]⁺, gefunden 535.27 [M]⁺;

HR-MS für [M]⁺: m/z berechnet für $C_{31}H_{40}N_2O_4P$: 535.27202, gefunden 535.27316 [M]⁺;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7.80 (m, 15H), 3.99 (m, 2H), 3.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 2.64 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.23 (s, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 169.3, 155.4, 133.2, 129.4, 129.2, 116.8, 84.3, 67.4, 37.3, 36.5, 29.9, 28.3, 26.5, 22.1, 20.8.

(5-((3-(aminoxy)propyl)amino)-5-oxopentyl)triphenylphosphonium (16)

Ein Gemisch aus TFA/CH₂Cl₂ (1:1) wurde zu 4 g der Verbindung (15) (7.47 mmol, 1 eq) gegeben. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/ MeOH/ Et₃N (98:1:1)) aufgereinigt.

Ausbeute: 3.11 g (0.01 mol, 96 %);

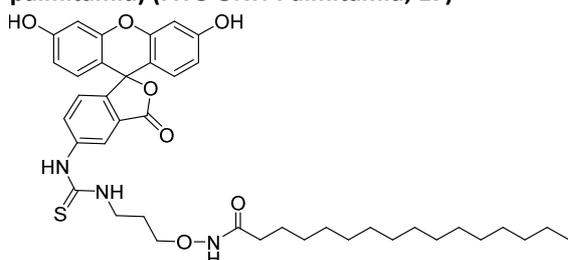
HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₆H₃₂N₂O₂P: 435.21 [M]⁺, gefunden 435.14 [M]⁺;

HR-MS für [M]⁺: m/z berechnet für C₂₆H₃₂N₂O₂P: 435.21959, gefunden 435.22039 [M]⁺;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7.80 (m, 15H), 3.99 (m, 2H), 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 2.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.23 (s, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.59 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 167.3, 133.2, 129.4, 129.2, 116.8, 67.4, 37.3, 36.5, 29.9, 26.5, 22.1, 20.8.

Synthese der Referenzen:

(N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro-[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thioureido)-propoxy)-palmitamid) (FITC-ONH-Palmitamid; 17)



Zu einer Lösung aus 100 mg der Verbindung (11) (0.21 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.13 mL Palmitoylchlorid (0.42 mmol, 2 eq) und 0.16 mL DIPEA (0.94 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 94 mg (0.13 mmol, 63 %);

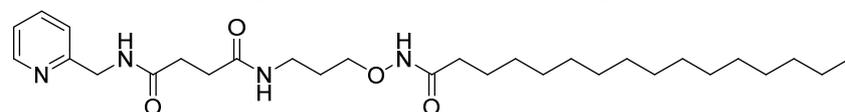
R_f-Wert: 0.75 MeOH/CH₂Cl₂ (1:9);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₄₀H₅₁N₃O₇S: 718.34 [M+H]⁺, gefunden 718.22 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₄₀H₅₁N₃O₇S: 718.35205, gefunden 718.35316 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 2H), 4.03 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 24H), 0.86 (t, J = 6.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.8.

N1-(3-(palmitamidooxy)propyl)-N4-(pyridin-2-ylmethyl)succinamid (18)



Zu einer Lösung aus 260 mg der Verbindung (13) (0.93 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.28 mL Palmitoylchlorid (0.93 mmol, 1 eq) und 0.19 mL Triethylamin (1.39 mmol, 2 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 80.39 mg (0.15 mmol, 17 %);

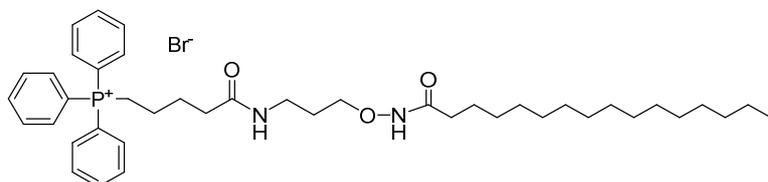
HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₉H₅₀N₄O₄: 519.38 [M+H]⁺, gefunden 519.24 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂₉H₅₀N₄O₄: 519.39048, gefunden 519.39028 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.51 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 10.2, 5.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 18.6, 10.0 Hz, 2H), 4.39-4.45 (m, 2H), 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.73 (d, J = 12.7, 6.7 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.53 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.22 (m, 24H), 0.86 (t, J = 6.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (126

MHz, DMSO- d_6): δ 173.8 (C=O), 172.3 (C=O), 156.3, 148.2, 140.1, 125.1, 120.8, 79.3, 73.3, 43.3, 30.9, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.20, 28.02, 27.9, 25.0, 22.1, 13.9.

(5-oxo-5-((3-(palmitamidoxy)-propyl)-amino)pentyl)triphenyl-phospho-nium (19)



Zu einer Lösung aus 200 mg der Verbindung (16) (0.46 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.14 mL Palmitoylchlorid (0.46 mmol, 1 eq) und 0.13 mL Triethylamin (0.92 mmol, 2 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

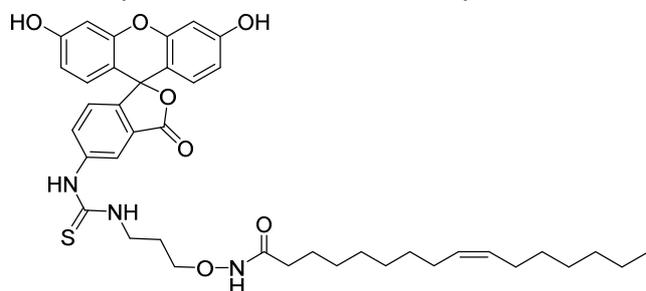
Ausbeute: 48.13 mg (0.07 mmol, 15 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{42}H_{62}N_2O_3P$: 673.45 $[M]^+$, gefunden 673.47 $[M]^+$;

HR-MS für $[M]^+$: m/z berechnet für $C_{42}H_{62}N_2O_3P$: 673.4493, gefunden 673.4481 $[M]^+$;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3-d$): δ 7.80 (m, 15H), 3.99 (m, 2H), 3.75 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 2.64 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 6.5$ Hz 2H), 2.23 (s, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 24H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3-d$): δ 167.3, 133.2, 129.4, 129.3, 116.8, 67.4, 43.3, 37.3, 36.5, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 26.5, 25.3, 22.1, 20.8, 13.8.

(E)-N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)-thioureido)-propoxy)-hexa-dec-9-enamid (FITC-ONH-Hexadecanamid; 20)



Zu einer Lösung aus 50 mg der Verbindung (11) (0.10 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.059 mL Palmitoleinsäure (0.21 mmol, 2 eq), 0.054 g PyBOP (0.10 mmol, 1eq) und 0.08 mL DIPEA (0.47 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

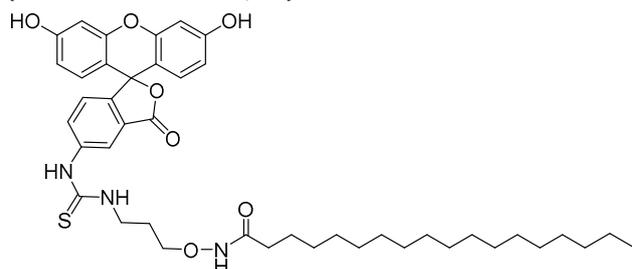
Ausbeute: 26.32 mg (0.04 mmol, 36 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{40}H_{49}N_3O_7S$: 716.32 $[M+H]^+$, gefunden 716.34 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{40}H_{49}N_3O_7S$: 716.33640, gefunden 716.33380 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 5.43 (m, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 4H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 20H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 152.6, 140.6, 136.2, 134.7, 130.06, 130.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 69.3, 47.1, 41.9, 32.3, 31.3, 29.4, 28.3, 27.1, 25.3, 22.5, 21.9, 14.7.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)-thio-ureido)-propoxy) stearamid (FITC-ONH-Stearamid; 21)



Zu einer Lösung aus 50 mg der Verbindung (11) (0.10 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.075 mL Stearylchlorid (0.21 mmol, 2 eq) und 0.08 mL DIPEA (0.47 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

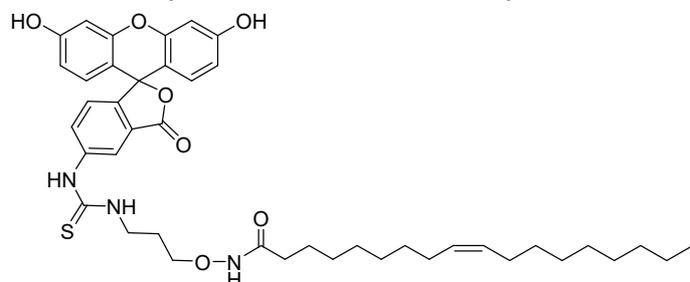
Ausbeute: 16.77 mg (0.02 mmol, 23 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{42}H_{55}N_3O_7S$: 746.37 $[M+H]^+$, gefunden 746.19 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{42}H_{55}N_3O_7S$: 746.38335, gefunden 746.38116 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (s, 28H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.01, 29.0, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.9.

(E)-N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen] -5-yl) -thioureido) -propoxy) -octadec-9-enamid (FITC-ONH-Octadecenamid; 22)



Zu einer Lösung aus 50 mg der Verbindung (11) (0.10 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.070 mL Oleoylchlorid (0.21 mmol, 2 eq) und 0.08 mL DIPEA (0.47 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

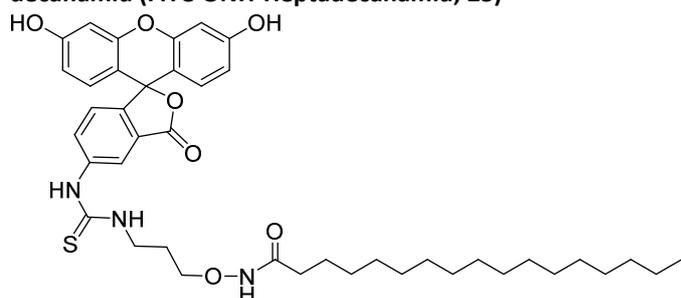
Ausbeute: 31.76 mg (0.04 mmol, 41 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{42}H_{53}N_3O_7S$: 744.36 $[M+H]^+$, gefunden 744.18 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{42}H_{53}N_3O_7S$: 744.36770, gefunden 744.36816 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 5.36 - 5.27 (m, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 4H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 20H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 152.6, 140.6, 136.2, 134.7, 130.7, 130.6, 130.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 69.3, 47.1, 41.9, 32.3, 31.3, 29.42, 28.31, 27.1, 25.3, 22.5, 21.9, 14.7.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen] -5-yl) -thio-ureido) -propoxy) -heptadecanamid (FITC-ONH-Heptadecanamid; 23)



Zu einer Lösung aus 50 mg der Verbindung (11) (0.10 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.071 mL Heptadecansäurechlorid (0.21 mmol, 2 eq) und 0.08 mL DIPEA (0.47 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

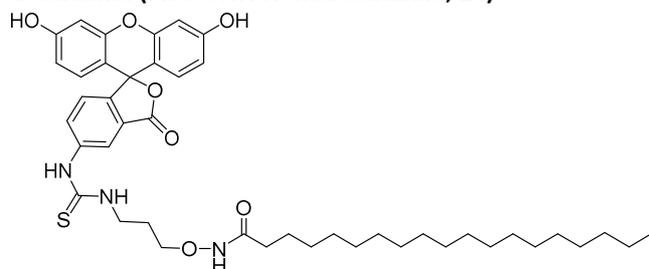
Ausbeute: 31.75 mg (0.04 mmol, 42 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{41}H_{53}N_3O_7S$: 732.36 $[M+H]^+$, gefunden 732.11 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{41}H_{53}N_3O_7S$: 732.36770, gefunden 732.36928 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.2 (dd, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 28H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.8.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen] -5-yl) -thio-ureido) -pro-poxy) -nonadecanamid (FITC-ONH-Nonadecanamid; 24)



Zu einer Lösung aus 50 mg der Verbindung (11) (0.10 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.070 mL Nonadecansäure (0.21 mmol, 2 eq), 0.054 g PyBOP (0.10 mmol, 1eq) und 0.08 mL DIPEA (0.47 mmol, 4.5 eq) gegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

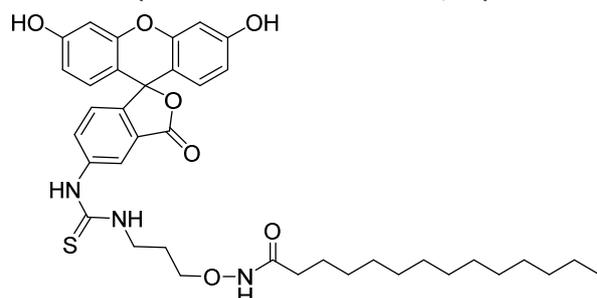
Ausbeute: 12.68 mg (0.02 mmol, 16 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{43}H_{57}N_3O_7S$: 760.39 $[M+H]^+$, gefunden 760.38 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{43}H_{57}N_3O_7S$: 760.3945, gefunden 760.3948 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 32H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.09, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.1, 13.9.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl) thioureido) -propoxy) -tetradecanamid (FITC-ONH-Tetradecanamid; 25)



Zu einer Lösung aus 40 mg der Verbindung (11) (0.08 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.045 mL Myristoylchlorid (0.17 mmol, 2 eq) und 0.064 mL DIPEA (0.38 mmol, 4.5 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

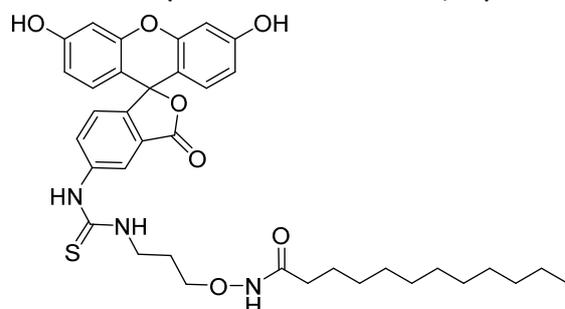
Ausbeute: 12.175 mg (0.02 mmol, 21 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{38}H_{47}N_3O_7S$: 690.32 $[M+H]^+$, gefunden 690.28 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{38}H_{47}N_3O_7S$: 690.3163, gefunden 690.3168 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.52 (s, 1H), 10.11 (s, 2H), 8.24 (d, $J = 6.4$ Hz 1H), 7.91 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.76 (m, 3H), 6.63 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.28 (m, 2H), 1.96 - 1.87 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.25 (m, 20H), 0.87 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.07, 29.06, 29.05, 29.03, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.9.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl) thioureido) -pro-poxy) dodecanamid (FITC-ONH-Dodecanamid; 26)



Zu einer Lösung aus 40 mg der Verbindung (11) (0.08 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.042 mL Dodecanoyl chlorid (0.17 mmol, 2 eq) und 0.064 mL DIPEA (0.38 mmol, 4.5 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

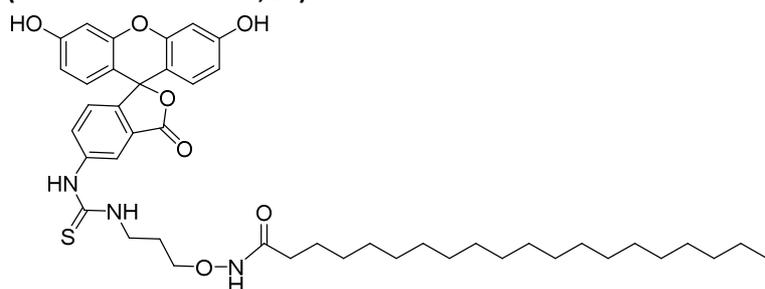
Ausbeute: 8.55 mg (0.01 mmol, 16 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{36}H_{43}N_3O_7S$: 662.28 $[M+H]^+$, gefunden 662.32 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{36}H_{43}N_3O_7S$: 662.2894, gefunden 662.2759 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.52 (s, 1H), 10.11 (s, 2H), 8.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.76 (m, 3H), 6.63 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.05 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.28 (m, 2H), 1.96 - 1.87 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.25 (m, 16H), 0.87 (t, $J = 6.0$ Hz 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.07, 29.06, 29.03, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.9.

N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl) thioureido) pro-poxy) -icosan-amid (FITC-ONH-Icosanamid; 27)



Zu einer Lösung aus 40 mg der Verbindung (11) (0.08 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 52.14 mg Arachinsäure (0.17 mmol, 2 eq) und 0.064 mL DIPEA (0.38 mmol, 4.5 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

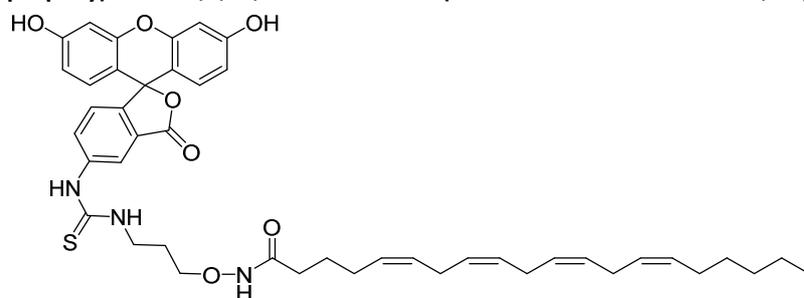
Ausbeute: 11.24 mg (0.01 mmol, 17 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{44}H_{59}N_3O_7S$: 774.41 $[M+H]^+$, gefunden 774.53 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{44}H_{59}N_3O_7S$: 774.4146, gefunden 774.3981 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 34H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 102.7, 83.2, 47.1, 43.3, 41.9, 29.9, 29.09, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.1, 13.9.

(5E,8E,11E,14E) -N-(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl) -thioureido) -propoxy) -icosa-5,8,11,14-tetraenamid (FITC-ONH-Icosatetraenamid; 28)



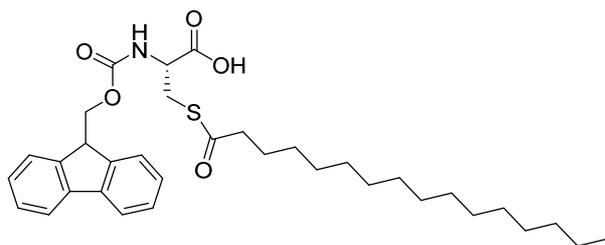
Zu einer Lösung aus 40 mg der Verbindung (11) (0.08 mmol, 1 eq) in trockenem DMF wurden 0.055 mL Arachidonsäure (0.17 mmol, 2 eq) und 0.064 mL DIPEA (0.38 mmol, 4.5 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wurde evaporiert und das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 8.14 mg (0.01 mmol, 13 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{44}H_{51}N_3O_7S$: 766.35 $[M+H]^+$, gefunden 766.58 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{44}H_{51}N_3O_7S$: 766.3476, gefunden 766.3462 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.51 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.75 (m, 3H), 6.62 (dd, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 2H), 5.49 - 5.31 (m, 8H), 4.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.95 - 1.89 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.22 (m, 16H), 0.87 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 179.4, 168.2, 168.1, 154.5, 154.3, 140.6, 136.2, 134.7, 129.3, 128.7, 128.1, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 126.9, 126.7, 126.4, 124.8, 109.2, 109.1, 108.1, 107.9, 103.2, 83.2, 47.1, 43.3, 37.9, 37.8, 37.7, 29.9, 29.0, 28.7, 28.6, 28.2, 25.3, 22.0, 13.9.

Pal-Baustein:**N-(((9H-fluoren-9-yl) methoxy) carbonyl)-S-palmitoyl-L-Cystein (29)**

3 g Fmoc Cys-(Trt)-OH (0.01 mol, 1 eq) wurden in 65 mL CH₂Cl₂ gelöst. Es wurden 5 % Trifluoressigsäure und 2.23 mL Triethylsilan (0.01 mol, 1.6 eq) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand wurde mit Toluol co-evaporiert und der wieder entstandene Rückstand im Anschluss mit Pentan gewaschen, um das entstandene Triphenylmethan zu entfernen. Nach Evaporation des Lösemittels wurde der Feststoff in CH₂Cl₂ gelöst und 5.63 mL Chlortrimethylsilan (0.03 mol, 3.65 eq) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Es wurden 4.51 mL Palmitoylchlorid zu der abgekühlten Lösung gegeben. Im Anschluss wurden 20 mL eines Gemisches aus 1.12 mL Triethylamin in 19.88 mL CH₂Cl₂ über 3 Stunden unter Schutzgas zu der Reaktion getropft. Nach einer weiteren Stunde wurde das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH/HCO₂H (98:2:1)) aufgereinigt.

Ausbeute: 3.46 g (0.01 mol, 68 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₃₄H₄₇NO₅S: 582.31 [M+H]⁺, gefunden 581.90 [M+H]⁺;

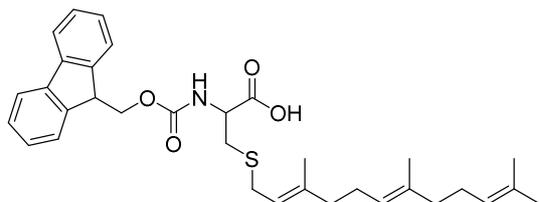
HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₃₄H₄₇NO₅S: 582.32477, gefunden 582.32546 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.44 (m, 3H), 7.32 (dd, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.18 (m, 3H), 4.04 (m, 1H), 3.44 (dd, *J* = 12.9, 4.1 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 13.4, 9.1 Hz, 1H), 2.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.47 (m, 2H), 1.20 (m, 24H), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 198.1, 171.8, 155.9, 143.7, 140.7, 127.5, 127.0, 125.2, 120.0, 65.8, 53.4, 46.6, 43.3, 31.3, 29.9, 29.08, 29.07, 29.06, 29.05, 29.04, 29.03, 29.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 25.0, 22.1, 13.9;

[α]²⁰_D = -2.2 (CHCl₃, c = 1.16).

MIC-Peptide für die N-Ras Lokalisationsstudien:

Die Peptidsynthese wurde manuell und unter Schutzgas durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden für 30 Minuten im Ultraschallbad unter Schutzgasatmosphäre vor ihrer Verwendung entgast. Die Beladung des 2-Chlorotriethyl-Harzes mit Fmoc-Cys(Far)-OH erfolgte nach Abschnitt 10.7.1. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einem Gemisch aus Piperidin/DMF (1:4), erfolgte der Aufbau der Peptidsequenz in iterativen Zyklen aus eben dieser Entschützung und den Kupplungen der Aminosäuren. Die Kupplung jeder Fmoc-geschützten Aminosäure wurde doppelt und jeweils über einen Zeitraum von 1 Stunde durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Gemisch der Fmoc-AS-OH (4 eq), HCTU (4 eq) und DIPEA (8 eq) in DMF zu dem vorbeladenen Harz gegeben. Im Anschluss an jede Kupplung wurde diese Kupplungslösung entfernt und die feste Phase dreimal für 5 Minuten mit DMF gewaschen, bevor der nächste Zyklus erfolgte. Im Anschluss an die Kupplung der Maleimidocaprinsäure (5 eq) erfolgte die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger nach Abschnitt 10.7.4. Für den finalen Schritt, der Methylierung der freien Säuregruppe, wurde dieses in einem Gemisch aus Toluol/Methanol (9:1) gelöst und langsam (über 30 Minuten) mit einem Gemisch aus 0.9 eq TMSCHN₂ (2M in Hexan), welches zuvor in Toluol/Methanol (9:1) gelöst wurde, versetzt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS konnte das gewünschte Peptid erhalten werden.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-farnesyl-L-cystein (Fmoc-Cys(Far)-OH) (30)

5 g L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat (31.72 mmol, 1 eq) wurden in 50 mL Methanol gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 68 mL einer 7 N Ammoniak-Methanol Lösung hinzuge tropft und für 5 Minuten gerührt. Anschließend wurden 8.3 mL *trans, trans*-Farnesylchlorid (31.72 mmol, 1eq) hinzugegeben und das Gemisch wurde für 3 Stunden bei 0 °C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und das Rohprodukt mehrfach mit *n*-Pentan gewaschen, um Rückstände des Farnesylchlorids zu entfernen. Der gewaschene Feststoff wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und erneut auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 10.36 g Fmoc-OSu (30.72 mmol, 1 eq) und 4.26 mL Triethylamin (30.72 mmol, 1 eq) wurde das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/ Methanol, 98:2) aufgereinigt.

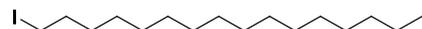
Ausbeute: 14.73 g (0.03 mol, 88 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₃₃H₄₇NO₄S: 548.75 [M+H]⁺, gefunden 548.11 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₃₃H₄₇NO₄S: 548.2835 [M+H]⁺, gefunden 548.04 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ = 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.17 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.05 (m, 2H), 4.28 (m, 3H), 4.15 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 4.5 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.6, 9.6 Hz, 1), 1.93 (m, 8H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (s, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6) δ 172.4, 156.0, 143.8, 140.7, 138.4, 134.5, 130.6, 127.6, 127.0, 125.2, 124.1, 123.6, 120.2, 120.1, 65.7, 53.9, 46.6, 39.7, 39.1, 32.0, 28.8, 26.2, 25.9, 25.4, 17.5, 15.7, 15.7;

[α]²⁰D = -9.29 (CHCl₃, c = 1.19).

1-Iodohexadecan (31)

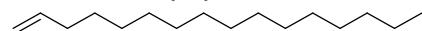
2 g 1-Hexadecanol (8.25 mmol, 1 eq) wurden in 40 mL trockenem Toluol gelöst und 0.91 mL Imidazol (16.50 mmol, 2 eq), 3.77 g Iod (0.01 mol, 1.8 eq), sowie 4.32 g PPh₃ (0.02 mol, 2 eq) wurden langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von gesättigter Na₂S₂O₃ Lösung und Ethylacetat, wurden die organischen Phasen extrahiert und erneut mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter niedrigem Druck aufkonzentriert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: quant.

GC-MS: m/z berechnet für C₁₆H₃₃I: 353.33 [M+H]⁺, gefunden 353.25 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₆H₃₃I: 353.163 [M+H]⁺, gefunden 353.156 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.56 (t, *J* = 7.2, 3H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.24-1.39 (m, 26H), 0.89 (t, *J* = 6.8, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

Hexadec-1-en (32)

3 g 1-Iodohexadecan (8.51 mmol, 1 eq) wurden in THF gelöst und 5.25 g KOtBu (0.05 mol, 5.5 eq) wurden hinzugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser und Ethylacetat, wurden die organischen Phasen extrahiert und erneut mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter niedrigem Druck aufkonzentriert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

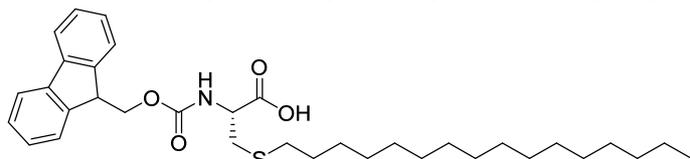
Ausbeute: 1.84 g (0.01 mol, 96 %);

GC-MS: m/z berechnet für $C_{16}H_{32}$: 225.42 $[M+H]^+$, gefunden 225.35 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{16}H_{32}$: 225.2504 $[M+H]^+$, gefunden 225.2510 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.93 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 2.56 (t, $J = 7.2$, 3H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.24-1.39 (m, 26H), 0.89 (t, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 139.2, 116.5, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

N-(((9H-fluoren-9-yl) methoxy) carbonyl)-S-pentadecyl-L-cystein (Fmoc-Cys(HD); 33)



3 g Fmoc-L-Cys(Trt)-OH wurden in 30 mL aus einem Gemisch aus CH_2Cl_2 /TFA/TES (50/45/5) gelöst und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt, der Rückstand in CH_2Cl_2 /TFA aufgenommen, der weiße Feststoff durch Filtration entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Für die radikale Alkylierung mittels 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) wurde Dichloroethan für 15 Minuten unter einem Argonstrom in einem Ultraschallbad entgast. 1.2 g des ungeschützten Cysteins (3.49 mmol, 1 eq) und 1.65 g des Hexadec-1-enes (0.01 mol, 2 eq) wurden in dem entgasten Dichloroethan gelöst und 0.287 g AIBN (1.75 mmol, 0.5 eq) unter Rühren dazu gegeben. Das Gemisch wurde für 3 Stunden bei 90°C refluxiert und anschließend die Reaktion bis hin zur Raumtemperatur heruntergekühlt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand wurde durch Säulen-Chromatographie (CH_2Cl_2 /MeOH (95:5)) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.84 g (3.34 mmol, 96 %);

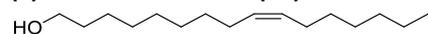
HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{33}H_{49}NO_4S$: 568.33 $[M+H]^+$, gefunden 567.95 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{33}H_{49}NO_4S$: 568.34551 $[M+H]^+$, gefunden 368.34524 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.31 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.82 (m, 1H), 4.67 (m, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.56 (t, $J = 7.2$, 3H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.24-1.39 (m, 26H), 0.89 (t, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 175.3, 156.2, 143.8, 141.3, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8, 67.7, 53.8, 47.4, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5;

$[\alpha]^{20D} = 6.2^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1$).

(E)-Hexadec-9-en-1-ol (34)



2 g Palmitoleinsäure (7.86 mmol, 1 eq) wurde in THF aufgelöst und tropfenweise zu einer gekühlten Suspension (0°C) aus 0.59 g $LiAlH_4$ (15.72 mmol, 2 eq) in THF gegeben. Die Mischung wurde 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 2 M NaOH-Lösung hinzugegeben um restliches $LiAlH_4$ abzureagieren. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter NaCl gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die flüchtigen Stoffe wurden unter vermindertem Druck entfernt und das gewünschte Produkt erhalten.

Ausbeute: 1.86 g (7.74 mmol, 98 %);

GC-MS: m/z berechnet für $C_{16}H_{32}O$: 241.42 $[M+H]^+$, gefunden 241.05 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{16}H_{32}O$: 241.2525 $[M+H]^+$, gefunden 241.2526 $[M+H]^+$;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.43 - 5.31 (m, 2H), 3.56 (t, $J = 7.2$, 2H), 2.21-2.08 (m, 4H), 1.24-1.39 (m, 18H), 0.89 (t, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 130.6, 130.5, 62.9, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

(E)-16-Iodohexadec-7-en (35)



2 g (E)-Hexadec-9-en-1-ol (8.32 mmol, 1eq) wurden in 65 mL trockenem Toluol gelöst und 1.13 g Imidazol (0.02 mol, 2 eq), 3.8 g Iod (0.01 mol, 1.8 eq), sowie 4.36 g PPh_3 (0.02 mol, 2 eq) wurden langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung und Ethylacetat, wurden die organischen Phasen extrahiert und erneut mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter niedrigem Druck aufkonzentriert. Triphenylphosphinoxid wurde in Petrolether ausgefällt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 2.61 g (7.44 mmol, 89 %);

GC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{I}$: 351.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 351.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{I}$: 351.1470 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 351.1775 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.43 - 5.31 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 2.21-2.08 (m, 4H), 1.84 (m, 2 H), 1.24-1.39 (m, 18H), 0.89 (t, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 130.6, 130.5, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

(E)-Octadeca-1,11-dien (36)



2.0 g Iodohexadec-7-en (5.71 mmol, 1 eq) wurden in 40 mL THF gelöst und 3.52 g KOtBu (0.03 mol, 5.5 eq) wurden in kleinen Mengen über einen Zeitraum von 2 Stunden hinzugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 40 mL Wasser unter Rühren hinzugegeben und die organische Phase mit dreimal 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl (2 x 40 mL) und Wasser (2 x 40 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt konnte nach Säulenchromatographie mit erhalten werden.

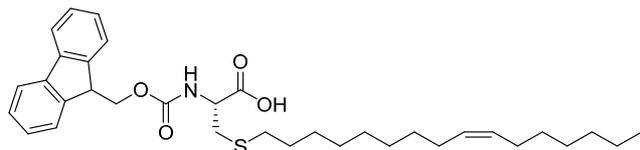
Ausbeute: 0.7 g (3.44 mmol, 60 %);

GC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{30}$: 223.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 223.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{30}$: 223.2348 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 223.2351 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.93 (m, 1H), 5.43 - 5.31 (m, 2H), 5.14 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 2.56 (t, $J = 7.2$, 3H), 2.29-2.09 (m, 6H), 1.24-1.39 (m, 16H), 0.89 (t, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 139.2, 130.6, 130.5, 116.5, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

(E)-N-(((9H-fluoren-9-yl)-methoxy) carbonyl)-S-(hexadec-9-en-1-yl)-L-cystein (Fmoc-Cys(HDD); 37)



3 g Fmoc-L-Cys(Trt)-OH wurden in 30mL aus einem Gemisch aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}/\text{TES}$ (50/45/5) gelöst und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt, der Rückstand in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ aufgenommen, der weiße Feststoff durch Filtration entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Für die radikale Alkylierung mittels 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) wurde Dichloroethan für 15 Minuten unter einem Argonstrom in einem Ultraschallbad entgast. 1.2 g des ungeschützten Cysteins (3.49 mmol, 1 eq) und 1.55 g des

Octadeca-1,11-diens (0.01 mol, 2 eq) wurden in dem entgasten Dichloroethan gelöst und 0.287 g AIBN (1.75 mmol, 0.5 eq) unter Rühren dazu gegeben. Das Gemisch wurde für 3 Stunden bei 90°C refluxiert und anschließend die Reaktion bis hin zur Raumtemperatur heruntergekühlt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand wurde durch Säulen-Chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH (95:5)) aufgereinigt.

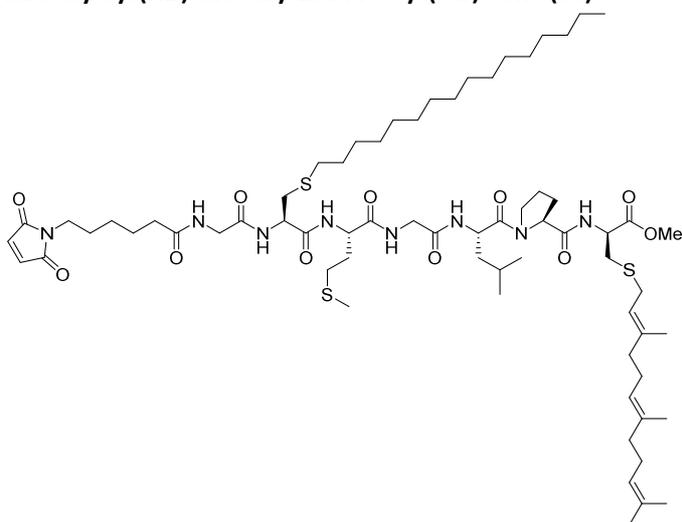
Ausbeute: 1.68 g (2.98 mmol, 85 %);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₃₃H₄₇NO₄S: 566.32 [M+H]⁺, gefunden 566.12 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₃₄H₄₇NO₄S: 566.32986 [M+H]⁺, gefunden 566.32957 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.82 (m, 1H), 5.43 - 5.31 (m, 2H), 4.67 (m, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.2, 2H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.24-1.39 (m, 20H), 0.89 (t, *J* = 6.8, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.3, 156.2, 143.8, 141.3, 130.6, 130.5, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8, 67.7, 53.8, 47.4, 34.5, 33.3, 32.2, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.1, 28.2, 27.2, 23.1, 14.5.

MIC-Gly-Cys(HD)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (38)

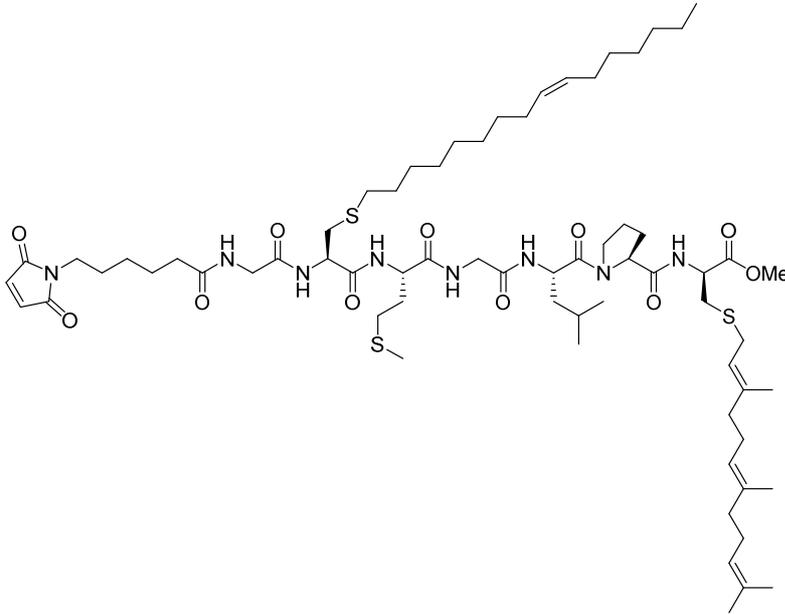


Ausbeute: 25 %;

HPLC-MS: m/z berechnet für C₆₈H₁₁₄N₈O₁₁S₃: 1315.76 [M+H]⁺, gefunden 1315.44 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₆₈H₁₁₄N₈O₁₁S₃: 1315.7685 [M+H]⁺, gefunden 1315.7594 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (m, 2H), 8.10 (d, *J* = 7.60 Hz, 1H), 8.01 (m, 1H), 7.92 (m, 2H), 5.13 (t, *J* = 8.08 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 6.65 Hz, 2H), 4.53 (m, 1H), 4.46-4.29 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.15 (q, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.60 (t, *J* = 9.80 Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.63 - 2.83 (m, 6H), 2.53-2.51 (m, 6H), 2.09 (t, *J* = 7.41, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.98-1.78 (m, 2 H), 1.64 (m, 1H), 1.61 (s, 6H), 1.54 (s, 6H), 1.47 (m, 5H), 1.31-1.14 (m, 30H), 0.84 (m, 9H), 0.74 (t, *J* = 6.14 Hz, 6H).

MIC-Gly-Cys(HDD)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (39)

Ausbeute: 21 %;

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{68}H_{112}N_8O_{11}S_3$: 1313.76 $[M+H]^+$, gefunden 1313.58 $[M+H]^+$;

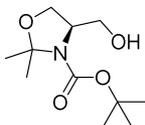
HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{68}H_{112}N_8O_{11}S_3$: 1313.7641 $[M+H]^+$, gefunden 1313.7654 $[M+H]^+$;

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (m, 2H), 8.10 (d, $J=7.60$ Hz, 1H), 8.01 (m, 1H), 7.92 (m, 2H), 5.43 - 5.31 (m, 2H), 5.13 (t, $J=8.08$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J=6.65$ Hz, 2H), 4.53 (m, 1H), 4.46-4.29 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.15 (q, $J=5.7$ Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.60 (t, $J=9.80$ Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.63 - 2.83 (m, 6H), 2.53-2.51 (m, 6H), 2.09 (t, $J=7.41$, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.98-1.78 (m, 2 H), 1.64 (m, 1H), 1.61 (s, 6H), 1.54 (s, 6H), 1.47 (m, 5H), 1.31-1.14 (m, 28H), 0.84 (m, 9H), 0.74 (t, $J=6.14$ Hz, 6H).

10.9 Synthese von Azido-Ceramid-Derivaten für die Evaluierung von Lipid-Protein Interaktionen

Mikroarray:

(S)-tert-butyl 4-(hydroxymethyl) -2, 2-dimethyl-oxa-zolidin-3-carboxylat (40)



10 g des kommerziell erhältlichen (*R*)-3-*tert*-butyl 4-methyl-2,2-dimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylates (38.5 mmol, 1 eq) wurden in 60 mL trockenem THF unter Argon gelöst und unter Rühren auf 0°C gekühlt. Bei einer konstanten Temperatur von 0°C wurden langsam 25 mL einer 2 M Lithiumborhydrid-Lösung in THF (1.03 mol, 26.66 eq) hinzugegeben und das Gemisch wurde für 30 Minuten gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Um Rückstände des Lithiumborhydrids abzureagieren, wurde die Lösung erneut auf 0°C gekühlt und vorsichtig eine gesättigte Lösung von Ammoniumchlorid zugegeben. Nach dreimaliger Extraktion mit jeweils 50 mL Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereint und erneut gewaschen. Dazu wurden zweimal jeweils 150 mL Wasser und dreimal jeweils 100 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung eingesetzt. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat (7:3)) aufgereinigt.^{291,324}

Ausbeute: 6.36 g (0.03 mol, 72 %);

R_f-Wert: 0.54 Cyclohexan/Ethylacetat (1:1);

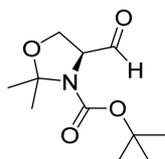
HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₁H₂₁NO₄: 232.15 [M+H]⁺, gefunden 232.71 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₁H₂₁NO₄: 232.15433, gefunden 232.15377 [M+H]⁺;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.15-3.90 (m, 1H), 3.85-3.47 (m, 4H), 3.25 (s, 1H), 1.53 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.44 (s, 9H);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 153.4, 94.1, 80.1, 65.5, 64.0, 53.5, 28.6, 24.3. ^{291,324}

(S)-tert-butyl 4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (Garner's Aldehyd) (41)



3.38 g der Verbindung (30) (14.6 mmol, 1 eq) wurden in 60 mL CH₂Cl₂ gelöst und 50 mL DMP (15 % in CH₂Cl₂) (161 mmol, 11.05 eq) wurden langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. 100 mL Diethylether wurden zugegeben und die organische Phase wurde mit 200 mL Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde vereinigt und nacheinander mit 130 mL einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung, 100 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde evaporiert und die Probe wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat (4:1)) aufgereinigt.²⁹¹

Ausbeute: 2.88 g (0.02 mol, 86 %);

R_f-Wert: 0.69 Cyclohexan/Ethylacetat (1:1);

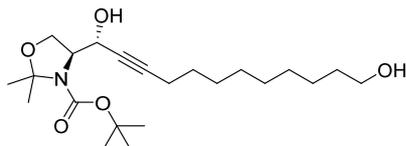
HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₁H₁₉NO₄: 230.13 [M+H]⁺, gefunden 230.67 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₁H₁₉NO₄: 230.13868, gefunden 230.13855 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.57 (d, J=29.4 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 4.08 (dd, J = 14.4, 7.0 Hz, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.43 (s, 9H);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 199.8, 151.4, 95.4, 81.9, 65.1, 64.3, 28.6, 26.06, 24.2. ²⁹¹

(R)-1-[(S)-2,2,3-trimethyloxazolidin-4-yl]dodec-2-yn-1,12-diol (42)



23 mL n-BuLi in 2.5 M Hexan (13.97 eq) wurden tropfenweise zu einer -20 °C gekühlten Lösung aus 4,61 mL Undec-10-yn-1-ol (24 mmol, 1,33 eq) in 15 mL trockenem THF gegeben und bei konstanter Temperatur für weitere 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden tropfenweise 4,61 mL DMPU (2.13 mmol, 2.11 eq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde auf -78 °C runtergekühlt. 4.14 g des Garner's Aldehyds (18 mmol, 1 eq) wurden in 2 mL trockenem THF gelöst und tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde für eine weitere Stunde bei -78 °C gerührt und in einem Zeitraum von 2 Stunden auf -20 °C aufgewärmt. 20 mL einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung wurden zum Quenchen der Reaktion hinzugegeben und der Ansatz wurde mit 100 mL Wasser verdünnt. Das Gemisch wurde dreimal mit 100 mL Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereint, und erneut mit 200 mL 0,5 N Salzsäure, 200 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde evaporiert und die Probe wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat (6:4)) aufgereinigt.²⁹¹

Ausbeute: 2.22 g (5,59 mmol, 31 %);

R_f-Wert: 0.29 in Cyclohexan/Ethylacetat (6:4);

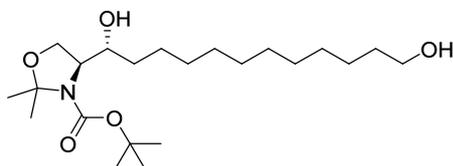
HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₇H₂₉NO₅: 398.28 [M+H]⁺, gefunden 397.81 [M+H]⁺;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{17}H_{29}NO_5$: 398.29010, gefunden 398.28925 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.45 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.74 (dd, $J = 11.0, 4.3$ Hz, 2H), 3.68 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 2.23 – 2.17 (m, 2H), 1.57 – 1.52 (m, 2H), 1.44 (m, 10H), 1.39 (s, 9H), 1.31 (m, 8H);

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 155.7, 98.8, 94.5, 73.1, 71.9, 65.4, 64.3, 63.3, 33.06, 31.2, 29.4, 28.7, 24.3, 19.3.²⁹¹

(S)-tert-butyl 4-[(R)-1,12-dihydroxydodecyl]-2,2-di-methyloxazolidin-3-carboxylat (43)



Für die Hydrierung wurden 10 mg des Rhodium-Katalysators Rh/Al_2O_3 portionsweise zu einer Lösung aus 37,6 mg (*R*)-1-[(*S*)-2,2,3-trimethyloxazolidin-4-yl] dodec-2-yne-1,12-diol (32) (0.09 mmol, 1 eq) in 2 mL trockenem Methanol gegeben. Der Reaktionsansatz wurde unter Wasserstoffzufuhr (1atm) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, über Celite gefiltert und abschließend wurde die Probe unter Vakuum aufkonzentriert.²⁹¹

Ausbeute: quant.

R_f -Wert: 0.34 in Cyclohexan/Ethylacetat (6:4)

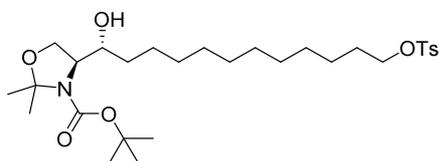
HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{22}H_{43}NO_5$: 402.31 $[M+H]^+$, gefunden 401.86 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{22}H_{43}NO_5$: 402.32140, gefunden 402.32105 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.40 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.09 – 3.71 (m, 2H), 3.63 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.53 – 3.45 (m, 2H), 1.55 – 1.39 (m, 17H), 1.31 – 1.16 (m, 14H);

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 155.7, 98.8, 94.5, 74.7, 63.4, 51.1, 34.8, 33.1, 31.2, 29.8, 28.7, 26.2, 25.9.²⁹¹

(S)-tert-butyl 4-((R)-1-hydroxy-12-(tosyloxy) do-decyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (44)



Für die Tosylierung des Alkohols (33) wurden 0.66 g des Alkohols (1.63 mmol, 1 eq) und 0.23 mL TEA (7.94 mmol, 4.86 eq) in 25 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und tropfenweise zur zu einer Lösung aus 465 mg Tosylchlorid (2.45 mmol, 1.5 eq) und 160 mg DMAP (1.31 mmol, 0.8 eq) in 15 mL trockenem CH_2Cl_2 gegeben und unter Argonstrom bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde mit 50 mL CH_2Cl_2 verdünnt, die organische Phase zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde evaporiert und die Probe wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat (9:1)) aufgereinigt.²⁹¹

Ausbeute: 0.43 g (0.77 mmol, 48 %);

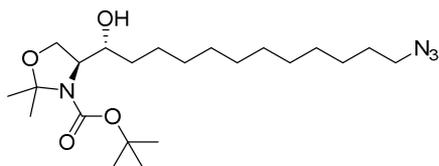
R_f -Wert: 0.3 in Cyclohexan/Ethylacetat (6:4);

HPLC-MS: m/z berechnet für $C_{29}H_{49}NO_7S$: 556,32 $[M+H]^+$, gefunden 555,82 $[M+H]^+$;

HR-MS für $[M+H]^+$: m/z berechnet für $C_{29}H_{49}NO_7S$: 556,33025, gefunden 556,33172 $[M+H]^+$;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.38 (s, 1H), 4.06 – 3.96 (m, 2H), 3.80 – 3.72 (m, 2H), 3.51 – 3.45 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.74 – 1.55 (m, 8H), 1.54 – 1.38 (m, 13H), 1.35 – 1.17 (m, 14H);

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 155.7, 144.9, 133.6, 130.1, 128.2, 74.8, 71.1, 63.06, 34.8, 31.3, 30.1, 29.6, 28.7, 26.3, 25.7, 22.02.²⁹¹

tert-butyl (S)-4-((R)-12-azido-1-hydroxydodecyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylate (45)

202 mg Natriumazid (3.1 mmol, 4.04 eq) wurden tropfenweise zu einer Lösung aus 0.428 g der Verbindung (34) (0.77 mmol, 1 eq) in 20 mL trockenem DMF gelöst. Die Reaktion wurde unter Argon über Nacht bei 80 °C gerührt, anschließend mit Wasser gequench und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde evaporiert und die Probe wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat (8:2)) aufgereinigt.²⁹¹

Ausbeute: 0.20 g (0.747 mmol, 61 %);

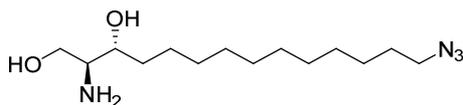
R_f-Wert: 0.74 in Cyclohexan/Ethylacetat (1:1);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₂₂H₄₂N₄O₄: 427.32 [M+H]⁺, gefunden 427.90 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₂₂H₄₂N₄O₄: 427.32788, gefunden 427.32821 [M+H]⁺;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, CH₃OD): δ 5.41 (s, 1H), 4.07 – 3.73 (m, 4H), 3.50 – 3.47 (m, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 8H), 1.50 – 1.38 (m, 13H), 1.32 – 1.16 (m, 14H);

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155.7, 110.2, 74.7, 68.3, 62.9, 51.9, 39.7, 34.8, 31.3, 29.8, 28.8, 2711, 26.3.²⁹¹

(2S,3R)-2-amino-14-azidotetradecan-1,3-diol (46)

0.54 mL Acetylchlorid (6 Vol%) wurden tropfenweise zu 200 mg des Carboxylates (35) (0.47 mmol, 1 eq) in 9 mL MeOH gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch in CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (8:1.9:0.1) aufgereinigt.²⁹¹

Ausbeute: 0.09 g (0.32 mmol, 69 %);

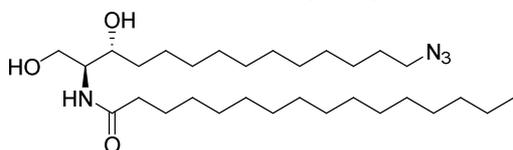
R_f-Wert: 0.45 in DCM/MeOH/NH₃ (8:1.9:0.1);

HPLC-MS: m/z berechnet für C₁₇H₂₉NO₅: 287.24 [M+H]⁺, gefunden 287.06 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₁₇H₂₉NO₅: 287.24415, gefunden 287.24437 [M+H]⁺;

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.46 (s, 1H), 3.27 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 2.56 (s, 1H), 1.63 – 1.47 (m, 4H), 1.44 (s, 2H), 1.41 – 1.19 (m, 18H);

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 70.6, 59.7, 56.6, 48.6, 33.5, 29.5, 29.3, 28.8, 28.8, 25.8, 23.6.²⁹¹

N-((2S,3R)-14-azido-1,3-dihydroxytetradecan-2-yl)-palmitamid (Azido-Dihydro-Ceramid) (47)

20 mg der Verbindung (36) wurden in 1 mL trockenem THF gelöst und bei 0 °C zu 1 mL einer 50 %-igen Natriumacetat-Lösung gegeben. Nach 10 Minuten wurden 0.023 mL Palmitoylchlorid (0.08 mmol, 1.1 eq) tropfenweise hinzugegeben. Das Gemisch rührte für 6 Stunden bei Raumtemperatur. Das Produkt wurde mit 2 mL Chloroform extrahiert und die organische Phase wurde erneut mit 2 mL 0.1 N Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mit 3 mL Diethylether aufgenommen. Nach Waschschrritten mit 2 mL 2 N Ammoniumhydroxid, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung wurde das Produkt über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel final evaporiert.²⁹¹

Ausbeute: 0.02g (0.04 mmol, 61 %);

R_F-Wert: 0.46 in CH₂Cl₂/MeOH (97:3);

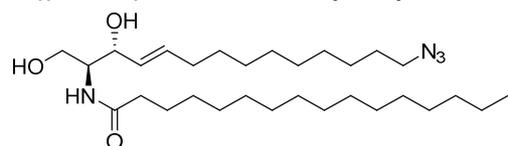
HPLC-MS: m/z berechnet für C₃₀H₆₀N₄O₃: 525,47 [M+H]⁺, gefunden 525,23 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₃₀H₆₀N₄O₃: 525.4738, gefunden 525.9217 [M+H]⁺;

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (s, 1H), 4.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.62 – 3.42 (m, 3H), 2.23 (s, 2H), 1.63 – 1.46 (m, 6H), 1.41 – 1.09 (m, 42H), 0.87 (s, 3H),

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 69.4, 62.4, 53.8, 51.02, 36.5, 34.3, 31.3, 29.6, 28.4, 26.6, 25.7, 22.4, 13.9.²⁹¹

N-((2S,3R,E)-14-azido-1,3-dihydroxytetradec-4-en-2-yl)palmitamid (Azido-Ceramid) (48)



20 mg (2S,3R,E)-2-amino-14-azidotetradec-4-ene-1,3-diol²⁹¹ wurden in 1 mL trockenem THF gelöst und bei 0 °C zu 1 mL einer 50 %-igen Natriumacetat-Lösung gegeben. Nach 10 Minuten wurden 0.023 mL Palmitoylchlorid (0.08 mmol, 1.1 eq) tropfenweise hinzugegeben. Das Gemisch rührte für 6 Stunden bei Raumtemperatur. Das Produkt wurde mit 2 mL Chloroform extrahiert und die organische Phase wurde erneut mit 2 mL 0.1 N Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mit 3 mL Diethylether aufgenommen. Nach Waschschrritten mit 2 mL 2 N Ammoniumhydroxid, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung wurde das Produkt über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel final evaporiert.²⁹¹

Ausbeute: 0.02g (0.04 mmol, 62 %);

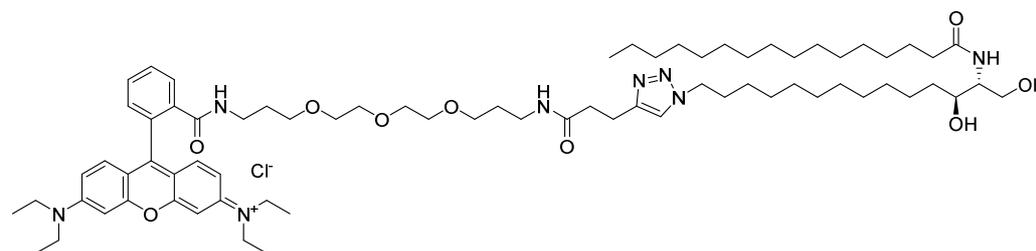
HPLC-MS: m/z berechnet für C₃₀H₅₈N₄O₃: 523,45 [M+H]⁺, gefunden 523,24 [M+H]⁺;

HR-MS für [M+H]⁺: m/z berechnet für C₃₀H₅₈N₄O₃: 523.4581 [M+H]⁺, gefunden 523.4577 [M+H]⁺;

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (s, 1H), 5.57 (m, 2H), 4.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.62 – 3.42 (m, 3H), 2.23 (s, 2H), 1.63 – 1.46 (m, 4H), 1.41 – 1.09 (m, 42H), 0.87 (s, 3H);

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 173.37, 133.78, 129.64, 69.46, 62.44, 53.86, 51.02, 36.59, 34.38, 28.40, 26.65, 25.71, 22.40, 13.96.²⁹¹

N-(6-(diethylamino)-9-(2-((17-(1-((12S,13R)-12,14-dihydroxy-13-palmitamidotetradecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxo-14-azaheptadecyl) carbamoyl) phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chlorid (49)



Test der Reaktionsbedingungen:

1) Chemische Bedingungen:

12 mg des Alkin-modifizierten Fluorophors (41) (0.02 mmol, 1.2 eq) wurden in 1 mL Ethanol/Wasser (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 7 mg des Azid-markierten Dihydroceramids (37) (0.01 mmol, 1 eq), Natriumascorbat (4 mg, 0.02 mmol, 1.5 eq) und 2 mg Kupfersulfat (0.01 mmol, 0.9 eq) wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels HPLC-MS überprüft.

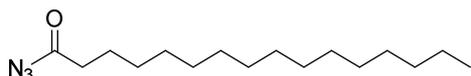
HPLC-MS: m/z berechnet für C₇₃H₁₁₇N₈O₉⁺: 1250,89 [M-Cl⁻+H]⁺, gefunden 1250,94 [M-Cl⁻+H]⁺.

2) Biologische Bedingungen:

2 μL einer 20 μM Stammlösung des Alkin-modifizierten Fluorophors (41) in DMSO wurden zusammen mit 1 μL einer 20 μM Stammlösung des Azid-markiertem Dihydroceramid (37) in DMSO, 1 μL TBTA (50 μM DMSO/tBuOH (1:4)-Stammlösung), 16 μL Kupfersulfat (0.5 mM Stammlösung in Wasser) und 33 μL Natriumascorbat (5 mM Stammlösung in Wasser) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels HPLC-MS überprüft.

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{73}\text{H}_{117}\text{N}_8\text{O}_9^+$: 1250,89 $[\text{M}-\text{Cl}^-+\text{H}]^+$, gefunden 1249,90 $[\text{M}-\text{Cl}^-+\text{H}]^+$.

Palmitoylazid (50)



Zu einer gut einer Suspension aus 500 mg (7.7 mmol, 1 eq) Natriumazid in Aceton wurden langsam 1.6 mL Palmitoyl-Chlorid (5.1 mmol, 0.6 eq) bei etwa 0 °C gegeben. Die Reaktionsmischung wurde kräftig für etwa eine halbe Stunde gerührt und auf etwa 0 °C gehalten. Nach Filtration und Trocknung des Filtrates konnte das Produkt in einer quantitativen Ausbeute erhalten werden

Ausbeute: quant.

HPLC-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}$: 282.43 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 282.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS für $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}$: 282.2539 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 282.2538 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

^1H -NMR (400 MHz Aceton- d_6): δ 2.41 (t, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.35 – 1.24 (m, 24H), 0.88 (s, 3H);

^{13}C -NMR (101 MHz, Aceton- d_6): δ 180.2, 38.7, 33.9, 32.2, 31.8, 31.6, 31.4, 31.3, 31.2, 31.1, 30.9, 30.7, 30.3, 26.7, 24.7, 15.8.

11 Literaturverzeichnis

- (1) Shevchenko, A.; Simons, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (8), 593.
- (2) Subramaniam, S.; Fahy, E.; Gupta, S.; Sud, M.; Byrnes, R. W.; Cotter, D.; Dinasarapu, A. R.; Maurya, M. R. Bioinformatics and Systems Biology of the Lipidome. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (10), 6452.
- (3) Zhao, Y.-Y.; Cheng, X.-I.; Lin, R.-C. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Kwang, W. J., Ed.; Academic Press, 2014; Vol. Volume 313.
- (4) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W. et al. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **2005**, *46* (5), 839.
- (5) Escribá, P. V.; González-Ros, J. M.; Goñi, F. M.; Kinnunen, P. K. J.; Vigh, L.; Sánchez-Magraner, L.; Fernández, A. M.; Busquets, X.; Horváth, I.; Barceló-Coblijn, G. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2008**, *12* (3), 829.
- (6) Kinnunen, P. K. J. On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases. *Chemistry and Physics of Lipids* **1996**, *81* (2), 151.
- (7) Lazar, T. The structure of biological membranes (2nd edn) P. Yeagle (ed.), CRC Press, 540 pp., ISBN 0-8493-1403-8 (2004). *Cell Biochemistry and Function* **2005**, *23* (4), 294.
- (8) Bretscher, M. S. Phosphatidyl-ethanolamine: Differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. *Journal of Molecular Biology* **1972**, *71* (3), 523.
- (9) Gascard, P.; Tran, D.; Sauvage, M.; Sulpice, J.-C.; Fukami, K.; Takenawa, T.; Claret, M.; Giraud, F. Asymmetric distribution of phosphoinositides and phosphatidic acid in the human erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, *1069* (1), 27.
- (10) Holthuis, J. C. M.; van Meer, G.; Huitema, K. Lipid microdomains, lipid translocation and the organization of intracellular membrane transport (Review). *Molecular Membrane Biology* **2003**, *20* (3), 231.
- (11) Disalvo, E. A. Membrane Hydration: A Hint to a New Model for Biomembranes. *Sub-cellular biochemistry* **2015**, *71*, 1.
- (12) Engelman, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **2005**, *438* (7068), 578.
- (13) Vereb, G.; Szöllösi, J.; Matkó, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vigh, L.; Mátyus, L.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (14), 8053.
- (14) Op den Kamp, J. A. F. Lipid Asymmetry in Membranes. *Annual Review of Biochemistry* **1979**, *48* (1), 47.
- (15) Marguet, D.; Lenne, P.-F.; Rigneault, H.; He, H.-T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *The EMBO Journal* **2006**, *25* (15), 3446.
- (16) Mabrey, S.; Mateo, P. L.; Sturtevant, J. M. High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines. *Biochemistry* **1978**, *17* (12), 2464.
- (17) Schutz, G. J.; Kada, G.; Pastushenko, V. P.; Schindler, H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *Embo j* **2000**, *19* (5), 892.
- (18) Pralle, A.; Keller, P.; Florin, E. L.; Simons, K.; Horber, J. K. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of cell biology* **2000**, *148* (5), 997.
- (19) Sachs, J. N.; Engelman, D. M. Introduction to the membrane protein reviews: the interplay of structure, dynamics, and environment in membrane protein function. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 707.
- (20) Hiller, S.; Abramson, J.; Mannella, C.; Wagner, G.; Zeth, K. The 3D structures of VDAC represent a native conformation. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35* (9), 514.
- (21) Wymann, M. P.; Schneider, R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 162.
- (22) Babu, M.; Vlasblom, J.; Pu, S.; Guo, X.; Graham, C.; Bean, B. D.; Burston, H. E.; Vizeacoumar, F. J.; Snider, J.; Phanse, S. et al. Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **2012**, *489* (7417), 585.
- (23) Saliba, A. E.; Vonkova, I.; Gavin, A. C. The systematic analysis of protein-lipid interactions comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16* (12), 753.
- (24) Sharpe, H. J.; Stevens, T. J.; Munro, S. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* **2010**, *142* (1), 158.
- (25) Nury, H.; Dahout-Gonzalez, C.; Trézéguet, V.; Lauquin, G.; Brandolin, G.; Pebay-Peyroula, E. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS letters* **2005**, *579* (27), 6031.

- (26) Whorton, M. R.; MacKinnon, R. Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G-Proteins, PIP₂, and sodium. *Cell* **2011**, *147* (1), 199.
- (27) Popoff, V.; Adolf, F.; Brugger, B.; Wieland, F. COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2011**, *3* (11), a005231.
- (28) Fang, Q.; Lindau, M. How Could SNARE Proteins Open a Fusion Pore? *Physiology* **2014**, *29* (4), 278.
- (29) Wang, C.; Xu, B.; Song, Q.-F.; Deng, Y.; Liu, W.; Xu, Z.-F. Manganese exposure disrupts SNARE protein complex-mediated vesicle fusion in primary cultured neurons. *Environmental Toxicology* **2016**, DOI:10.1002/tox.22272 10.1002/tox.22272, n/a.
- (30) Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 99.
- (31) Antony, B. Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 101.
- (32) Scott, J. D.; Pawson, T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *326* (5957), 1220.
- (33) Rocks, O.; Gerauer, M.; Vartak, N.; Koch, S.; Huang, Z. P.; Pechlivanis, M.; Kuhlmann, J.; Brunsveld, L.; Chandra, A.; Ellinger, B. et al. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* **2010**, *141* (3), 458.
- (34) Rocks, O.; Peyker, A.; Kahms, M.; Verveer, P. J.; Koerner, C.; Lumbierres, M.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science (New York, N.Y.)* **2005**, *307* (5716), 1746.
- (35) Nath, S.; Dancourt, J.; Shteyn, V.; Puente, G.; Fong, W. M.; Nag, S.; Bewersdorf, J.; Yamamoto, A.; Antony, B.; Melia, T. J. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat Cell Biol* **2014**, *16* (5), 415.
- (36) Funari, S. S.; Prades, J.; Escribá, P. V.; Barceló, F. Farnesol and geranylgeraniol modulate the structural properties of phosphatidylethanolamine model membranes. *Molecular Membrane Biology* **2005**, *22* (4), 303.
- (37) Barceló, F.; Prades, J.; Encinar, J. A.; Funari, S. S.; Vögler, O.; González-Ros, J. M.; Escribá, P. V. Interaction of the C-Terminal Region of the Gy Protein with Model Membranes. *Biophysical Journal* **2007**, *93* (7), 2530.
- (38) Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (10), 739.
- (39) Grabon, A.; Khan, D.; Bankaitis, V. A. Phosphatidylinositol Transfer Proteins and Instructive Regulation of Lipid Kinase Biology. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1851* (6), 724.
- (40) Holthuis, J. C. M.; Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **2014**, *510* (7503), 48.
- (41) Musille, P. M.; Kohn, J. A.; Ortlund, E. A. Phospholipid – Driven gene regulation. *FEBS letters* **2013**, *587* (8), 1238.
- (42) Blom, T.; Li, S.; Dichlberger, A.; Back, N.; Kim, Y. A.; Loizides-Mangold, U.; Riezman, H. LAPT4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. **2015**, *11* (10), 799.
- (43) Beloribi-Djefafli, S.; Vasseur, S.; Guillaumond, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e189.
- (44) Baenke, F.; Peck, B.; Miess, H.; Schulze, A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms* **2013**, *6* (6), 1353.
- (45) Human Genome Sequencing, C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431* (7011), 931.
- (46) Nørregaard Jensen, O. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8* (1), 33.
- (47) Ayoubi, T. A.; Van De Ven, W. J. Regulation of gene expression by alternative promoters. *The FASEB Journal* **1996**, *10* (4), 453.
- (48) Walsh, C.; Roberts and Co. Publishers: Englewood, Colo. , 2006.
- (49) Imai, S.; Armstrong, C. M.; Kaeberlein, M.; Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **2000**, *403* (6771), 795.
- (50) Glozak, M. A.; Sengupta, N.; Zhang, X.; Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **2005**, *363*, 15.
- (51) Wang, X.; Quinn, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research* **2010**, *49* (2), 97.
- (52) Smotrýs, J. E.; Linder, M. E. Palmitoylation of intracellular signaling-G-Proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **2004**, *73*, 559.

- (53) Resh, M. D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Sub-cellular biochemistry* **2004**, 37, 217.
- (54) Ho, K. S.; Scott, M. P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology* **2002**, 12 (1), 57.
- (55) Topinka, J. R.; Bredt, D. S. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron* **1998**, 20 (1), 125.
- (56) Gubitosi-Klug, R. A.; Mancuso, D. J.; Gross, R. W. The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102 (17), 5964.
- (57) Drisdell, R. C.; Alexander, J. K.; Sayeed, A.; Green, W. N. Assays of protein palmitoylation. *Methods* **2006**, 40 (2), 127.
- (58) Schmidt, J. W.; Catterall, W. A. Palmitoylation, sulfation, and glycosylation of the alpha subunit of the sodium channel. Role of post-translational modifications in channel assembly. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262 (28), 13713.
- (59) Drisdell, R. C.; Green, W. N. Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *BioTechniques* **2004**, 36 (2), 276.
- (60) Touz, M. C.; Conrad, J. T.; Nash, T. E. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology* **2005**, 58 (4), 999.
- (61) Chen, B. J.; Takeda, M.; Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *Journal of virology* **2005**, 79 (21), 13673.
- (62) Webb, Y.; Hermida-Matsumoto, L.; Resh, M. D. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275 (1), 261.
- (63) Moffett, S.; Brown, D. A.; Linder, M. E. Lipid-dependent targeting of G-Proteins into rafts. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275 (3), 2191.
- (64) Roth, A. F.; Feng, Y.; Chen, L.; Davis, N. G. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *The Journal of cell biology* **2002**, 159 (1), 23.
- (65) Triola, G.; Waldmann, H.; Hedberg, C. Chemical Biology of Lipidated Proteins. *ACS Chemical Biology* **2012**, 7 (1), 87.
- (66) Tsutsumi, R.; Fukata, Y.; Fukata, M. Discovery of protein-palmitoylating enzymes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2008**, 456 (6), 1199.
- (67) Yang, W.; Di Vizio, D.; Kirchner, M.; Steen, H.; Freeman, M. R. Proteome Scale Characterization of Human S-Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* **2010**, 9 (1), 54.
- (68) Linder, M. E.; Deschenes, R. J. New Insights into the Mechanisms of Protein Palmitoylation. *Biochemistry* **2003**, 42 (15), 4311.
- (69) Resh, M. D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature chemical biology* **2006**, 2 (11), 584.
- (70) Devedjiev, Y.; Dauter, Z.; Kuznetsov, S. R.; Jones, T. L.; Derewenda, Z. S. Crystal structure of the human acyl protein thioesterase I from a single X-ray data set to 1.5 Å. *Structure (London, England : 1993)* **2000**, 8 (11), 1137.
- (71) Duncan, J. A.; Gilman, A. G. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G-Protein alpha subunits and p21(RAS). *The Journal of biological chemistry* **1998**, 273 (25), 15830.
- (72) Shanado, Y.; Kometani, M.; Uchiyama, H.; Koizumi, S.; Teno, N. Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 325 (4), 1487.
- (73) Veit, M.; Schmidt, M. F. G. Enzymatic Depalmitoylation of Viral Glycoproteins with Acyl-Protein Thioesterase 1 in Vitro. *Virology* **2001**, 288 (1), 89.
- (74) Sunaga, H.; Sugimoto, H.; Nagamachi, Y.; Yamashita, S. Purification and properties of lysophospholipase isoenzymes from pig gastric mucosa. *Biochemical Journal* **1995**, 308 (Pt 2), 551.
- (75) Barbacid, M. ras genes. *Annu Rev Biochem* **1987**, 56, 779.
- (76) Mulder, M. P.; Keijzer, W.; Verkerk, A.; Boot, A. J.; Prins, M. E.; Splinter, T. A.; Bos, J. L. Activated ras genes in human seminoma: evidence for tumor heterogeneity. *Oncogene* **1989**, 4 (11), 1345.
- (77) Hulce, J. J.; Joslyn, C.; Speers, A. E.; Brown, S. J.; Spicer, T.; Fernandez-Vega, V.; Ferguson, J.; Cravatt, B. F.; Hodder, P.; Rosen, H. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*; National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2010.

- (78) Adibekian, A.; Martin, B. R.; Chang, J. W.; Hsu, K. L.; Tsuboi, K.; Bachovchin, D. A.; Speers, A. E.; Brown, S. J.; Spicer, T.; Fernandez-Vega, V. et al. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*; National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2010.
- (79) Fujita, J.; Yoshida, O.; Yuasa, Y.; Rhim, J. S.; Hatanaka, M.; Aaronson, S. A. Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* **1984**, *309* (5967), 464.
- (80) Giehl, K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biological chemistry* **2005**, *386* (3), 193.
- (81) Ismail, S. A.; Chen, Y. X.; Rusinova, A.; Chandra, A.; Bierbaum, M.; Gremer, L.; Triola, G.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I.; Wittinghofer, A. Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nature chemical biology* **2011**, *7* (12), 942.
- (82) Gille, H.; Downward, J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (31), 22033.
- (83) Marshall, M. S. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, *9* (13), 1311.
- (84) Clark, E. A.; Hynes, R. O. Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and Zytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271* (25), 14814.
- (85) Howe, A. K.; Juliano, R. L. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (42), 27268.
- (86) Zhang, Z.; Wang, H.; Li, M.; Agrawal, S.; Chen, X.; Zhang, R. MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (16), 16000.
- (87) Feig, L. A. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* **1999**, *1* (2), E25.
- (88) Trahey, M.; Milley, R. J.; Cole, G. E.; Innis, M.; Paterson, H.; Marshall, C. J.; Hall, A.; McCormick, F. Biochemical and biological properties of the human N-ras p21 protein. *Molecular and cellular biology* **1987**, *7* (1), 541.
- (89) Trahey, M.; McCormick, F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science (New York, N.Y.)* **1987**, *238* (4826), 542.
- (90) Mistou, M. Y.; Jacquet, E.; Pouillet, P.; Rensland, H.; Gideon, P.; Schlichting, I.; Wittinghofer, A.; Parmeggiani, A. Mutations of Ha-ras p21 that define important regions for the molecular mechanism of the SDC25 C-domain, a guanine nucleotide dissociation stimulator. *Embo j* **1992**, *11* (7), 2391.
- (91) Muller, O.; Frech, M.; Gideon, P.; Wittinghofer, A.; Schwarz, M. Differences in GTPase-activating-Protein activity between liver tumors and normal liver tissue in mice. *Oncogene* **1992**, *7* (7), 1407.
- (92) Gideon, P.; John, J.; Frech, M.; Lautwein, A.; Clark, R.; Scheffler, J. E.; Wittinghofer, A. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating-Protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Molecular and cellular biology* **1992**, *12* (5), 2050.
- (93) Denhardt, D. T. Oncogene-initiated aberrant signaling engenders the metastatic phenotype: synergistic transcription factor interactions are targets for cancer therapy. *Critical reviews in oncogenesis* **1996**, *7* (3-4), 261.
- (94) Denhardt, D. T. Signal-transducin-Protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *The Biochemical journal* **1996**, *318* (Pt 3), 729.
- (95) Scheffzek, K.; Lautwein, A.; Scherer, A.; Franken, S.; Wittinghofer, A. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the Ras-GTPase-activating domain of human p120GAP. *Proteins* **1997**, *27* (2), 315.
- (96) Ahmadian, M. R.; Stege, P.; Scheffzek, K.; Wittinghofer, A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nature structural biology* **1997**, *4* (9), 686.
- (97) Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmuller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science (New York, N.Y.)* **1997**, *277* (5324), 333.
- (98) Wittinghofer, A.; Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R. The interaction of Ras with GTPase-activating-Proteins. *FEBS letters* **1997**, *410* (1), 63.
- (99) Schweins, T.; Scheffzek, K.; Assheuer, R.; Wittinghofer, A. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn²⁺ versus Mg²⁺. *J Mol Biol* **1997**, *266* (4), 847.
- (100) Hamilton, M.; Wolfman, A. Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* **1998**, *16* (11), 1417.

- (101) Hamilton, M.; Wolfman, A. Oncogenic Ha-Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activity requires signaling through the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (43), 28155.
- (102) Lowy, D. R.; Johnson, M. R.; DeClue, J. E.; Cen, H.; Zhang, K.; Papageorge, A. G.; Vass, W. C.; Willumsen, B. M.; Valentine, M. B.; Look, A. T. Cell transformation by ras and regulation of its protein product. *Ciba Foundation symposium* **1993**, *176*, 67.
- (103) Lowy, D. R.; Willumsen, B. M. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* **1993**, *62*, 851.
- (104) Boriack-Sjodin, P. A.; Margarit, S. M.; Bar-Sagi, D.; Kuriyan, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **1998**, *394* (6691), 337.
- (105) Hall, B. E.; Yang, S. S.; Boriack-Sjodin, P. A.; Kuriyan, J.; Bar-Sagi, D. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (29), 27629.
- (106) Bauer, B.; Mirey, G.; Vetter, I. R.; Garcia-Ranea, J. A.; Valencia, A.; Wittinghofer, A.; Camonis, J. H.; Cool, R. H. Effector recognition by the small GTP-binding-Proteins Ras and Ral. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (25), 17763.
- (107) Kim, E.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Taylor, B.; Ashby, M.; Shannon, K.; Casey, P. J.; Young, S. G. Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (13), 8383.
- (108) Otto, J. C.; Kim, E.; Young, S. G.; Casey, P. J. Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (13), 8379.
- (109) Dai, Q.; Choy, E.; Chiu, V.; Romano, J.; Slivka, S. R.; Steitz, S. A.; Michaelis, S.; Philips, M. R. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (24), 15030.
- (110) Weise, K.; Triola, G.; Brunsveld, L.; Waldmann, H.; Winter, R. Influence of the Lipidation Motif on the Partitioning and Association of N-Ras in Model Membrane Subdomains. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (4), 1557.
- (111) Roy, M. O.; Leventis, R.; Silviu, J. R. Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* **2000**, *39* (28), 8298.
- (112) Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A.; Hoffmann, M.; Hahn, S. A.; Triola, G.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I. et al. Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **2013**, *497* (7451), 638.
- (113) Simons, K.; Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1* (1), 31.
- (114) Prior, I. A.; Harding, A.; Yan, J.; Sluimer, J.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* **2001**, *3* (4), 368.
- (115) Prior, I. A.; Hancock, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of cell science* **2001**, *114* (Pt 9), 1603.
- (116) Vogel, A.; Nikolaus, J.; Weise, K.; Triola, G.; Waldmann, H.; Winter, R.; Herrmann, A.; Huster, D. Interaction of the human N-Ras protein with lipid raft model membranes of varying degrees of complexity. *Biological chemistry* **2014**, *395* (7-8), 779.
- (117) Weise, K.; Kapoor, S.; Denter, C.; Nikolaus, J.; Opitz, N.; Koch, S.; Triola, G.; Herrmann, A.; Waldmann, H.; Winter, R. Membrane-Mediated Induction and Sorting of K-Ras Microdomain Signaling Platforms. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (4), 880.
- (118) Weise, K.; Kapoor, S.; Werkmüller, A.; Möbitz, S.; Zimmermann, G.; Triola, G.; Waldmann, H.; Winter, R. Dissociation of the K-Ras4B/PDEδ Complex upon Contact with Lipid Membranes: Membrane Delivery Instead of Extraction. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (28), 11503.
- (119) Broncel, M.; Serwa, R. A.; Ciepla, P.; Krause, E.; Dallman, M. J.; Magee, A. I.; Tate, E. W. Myristoylation profiling in human cells and zebrafish. *Data in brief* **2015**, *4*, 379.
- (120) Greaves, J.; Munro, K. R.; Davidson, S. C.; Riviere, M.; Wojno, J.; Smith, T. K.; Tomkinson, N. C.; Chamberlain, L. H. Molecular basis of fatty acid selectivity in the zDHHC family of S-acyltransferases revealed by click chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (8), E1365.
- (121) Sorek, N.; Gutman, O.; Bar, E.; Abu-Abied, M.; Feng, X.; Running, M. P.; Lewinsohn, E.; Ori, N.; Sadot, E.; Henis, Y. I. et al. Differential effects of prenylation and s-acylation on type I and II ROPS membrane interaction and function. *Plant physiology* **2011**, *155* (2), 706.
- (122) Sorek, N.; Segev, O.; Gutman, O.; Bar, E.; Richter, S.; Poraty, L.; Hirsch, J. A.; Henis, Y. I.; Lewinsohn, E.; Jurgens, G. et al. An S-acylation switch of conserved G domain cysteines is required for polarity signaling by ROP GTPases. *Current biology : CB* **2010**, *20* (10), 914.
- (123) Sorek, N.; Yalovsky, S. Analysis of protein S-acylation by gas chromatography-coupled mass spectrometry using purified proteins. *Nature protocols* **2010**, *5* (5), 834.

- (124) Hofmann, U.; Holzer, S.; Meese, C. O. Pentafluorophenyldiazoalkanes as novel derivatization reagents for the determination of sensitive carboxylic acids by gas chromatography—negative-ion mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1990**, *508*, 349.
- (125) Ojala, M.; Kotiaho, T.; Siirilä, J.; Sihvonen, M.-L. Analysis of aldehydes and ketones from beer as O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives. *Talanta* **1994**, *41* (8), 1297.
- (126) Bird, S. S.; Marur, V. R.; Sniatynski, M. J.; Greenberg, H. K.; Kristal, B. S. Lipidomics Profiling by High-Resolution LC–MS and High-Energy Collisional Dissociation Fragmentation: Focus on Characterization of Mitochondrial Cardiolipins and Monolysocardiolipins. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (3), 940.
- (127) Higashi, T.; Ichikawa, T.; Inagaki, S.; Min, J. Z.; Fukushima, T.; Toyo'oka, T. Simple and practical derivatization procedure for enhanced detection of carboxylic acids in liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, *52* (5), 809.
- (128) Inagaki, S.; Tano, Y.; Yamakata, Y.; Higashi, T.; Min, J. Z.; Toyo'oka, T. Highly sensitive and positively charged precolumn derivatization reagent for amines and amino acids in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2010**, *24* (9), 1358.
- (129) Haynes, C. A.; Allegood, J. C.; Sims, K.; Wang, E. W.; Sullards, M. C.; Merrill, A. H. Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* **2008**, *49* (5), 1113.
- (130) Xie, Q. W.; Leung, M.; Fuortes, M.; Sassa, S.; Nathan, C. Complement analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (10), 4891.
- (131) Olmsted, J. B.; Carlson, K.; Klebe, R.; Ruddle, F.; Rosenbaum, J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1970**, *65* (1), 129.
- (132) Kakugawa, S.; Langton, P. F.; Zebisch, M.; Howell, S. A.; Chang, T.-H.; Liu, Y.; Feizi, T.; Bineva, G.; O'Reilly, N.; Snijders, A. P. et al. Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature* **2015**, *519* (7542), 187.
- (133) Rusch, M.; Zimmermann, T. J.; Burger, M.; Dekker, F. J.; Gormer, K.; Triola, G.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Bottcher, T.; Sieber, S. A. et al. Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2011**, *50* (42), 9838.
- (134) Tomatis, V. M.; Trenchi, A.; Gomez, G. A.; Daniotti, J. L. Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43. *PLoS one* **2010**, *5* (11), e15045.
- (135) Lin, D. T. S.; Conibear, E. ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *eLife* **2015**, *4*, e11306.
- (136) Liu, G.; Lynch, J. K.; Freeman, J.; Liu, B.; Xin, Z.; Zhao, H.; Serby, M. D.; Kym, P. R.; Suhar, T. S.; Smith, H. T. et al. Discovery of potent, selective, orally bioavailable stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50* (13), 3086.
- (137) Carcel-Trullols, J.; Kovacs, A. D.; Pearce, D. A. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1852* (10 Pt B), 2242.
- (138) Schlegel, H. *NCL. Zur Lebenssituation von blinden Kindern und Heranwachsenden mit einer unheilbaren Abbauerkkrankung. Beiträge aus Pädagogik, Therapie und Medizin.*; Verein zur Förderung der Blindenbildung; Universitätsbibliothek Erlangen-Nürnberg, 2001.
- (139) Kohlschütter, A.; Goebel, H.-H.; Schulz, A.; Lukacs, Z. Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen: Demenzerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. *Dtsch Arztebl International* **2005**, *102* (5), 284.
- (140) Kohlschütter, A.; Goebel, H. H. Die Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen: Neurodegenerative Krankheiten des Kindesalters auf dem Weg zur Aufklärung. *Dtsch Arztebl International* **1997**, *94* (47), 3183.
- (141) Nugent, T.; Mole, S. E.; Jones, D. T. The transmembrane topology of Batten disease protein CLN3 determined by consensus computational prediction constrained by experimental data. *FEBS letters* **2008**, *582* (7), 1019.
- (142) Chan, C. H.; Mitchison, H. M.; Pearce, D. A. Transcript and in silico analysis of CLN3 in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis and associated mouse models. *Human molecular genetics* **2008**, *17* (21), 3332.
- (143) Ezaki, J.; Takeda-Ezaki, M.; Koike, M.; Ohsawa, Y.; Taka, H.; Mineki, R.; Murayama, K.; Uchiyama, Y.; Ueno, T.; Kominami, E. Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *Journal of neurochemistry* **2003**, *87* (5), 1296.
- (144) Fossale, E.; Wolf, P.; Espinola, J. A.; Lubicz-Nawrocka, T.; Teed, A. M.; Gao, H.; Rigamonti, D.; Cattaneo, E.; MacDonald, M. E.; Cotman, S. L. Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede

- subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC neuroscience* **2004**, *5*, 57.
- (145) Kama, R.; Kanneganti, V.; Ungermann, C.; Gerst, J. E. The yeast Batten disease orthologue Btn1 controls endosome-Golgi retrograde transport via SNARE assembly. *The Journal of cell biology* **2011**, *195* (2), 203.
- (146) Codlin, S.; Mole, S. E. S. *pombe* btn1, the orthologue of the Batten disease gene CLN3, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p. *Journal of cell science* **2009**, *122* (Pt 8), 1163.
- (147) Cao, Y.; Espinola, J. A.; Fossale, E.; Massey, A. C.; Cuervo, A. M.; MacDonald, M. E.; Cotman, S. L. Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (29), 20483.
- (148) Golabek, A. A.; Kida, E.; Walus, M.; Kaczmarek, W.; Michalewski, M.; Wisniewski, K. E. CLN3-Protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells. *Molecular genetics and metabolism* **2000**, *70* (3), 203.
- (149) Huber, R. J.; Myre, M. A.; Cotman, S. L. Loss of Cln3 function in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* causes pleiotropic effects that are rescued by human CLN3. *PLoS one* **2014**, *9* (10), e110544.
- (150) Getty, A. L.; Benedict, J. W.; Pearce, D. A. A novel interaction of CLN3 with nonmuscle myosin-IIb and defects in cell motility of Cln3(-/-) cells. *Experimental cell research* **2011**, *317* (1), 51.
- (151) Weimer, J. M.; Benedict, J. W.; Getty, A. L.; Pontikis, C. C.; Lim, M. J.; Cooper, J. D.; Pearce, D. A. Cerebellar defects in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain research* **2009**, *1266*, 93.
- (152) Kang, S.; Kim, J. B.; Heo, T. H.; Kim, S. J. Cell cycle arrest in Batten disease lymphoblast cells. *Gene* **2013**, *519* (2), 245.
- (153) Rusyn, E.; Mousallem, T.; Persaud-Sawin, D. A.; Miller, S.; Boustany, R. M. CLN3p impacts galactosylceramide transport, raft morphology, and lipid content. *Pediatric research* **2008**, *63* (6), 625.
- (154) Zhu, X.; Huang, Z.; Chen, Y.; Zhou, J.; Hu, S.; Zhi, Q.; Song, S.; Wang, Y.; Wan, D.; Gu, W. et al. Effect of CLN3 silencing by RNA interference on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2014**, *68* (3), 253.
- (155) Wu, D.; Liu, J.; Wu, B.; Tu, B.; Zhu, W.; Luo, J. The Batten disease gene CLN3 confers resistance to endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *447* (1), 115.
- (156) Punta, M.; Coghill, P. C.; Eberhardt, R. Y.; Mistry, J.; Tate, J.; Boursnell, C.; Pang, N.; Forslund, K.; Ceric, G.; Clements, J. et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40* (Database issue), D290.
- (157) Narayan, S. B.; Rakheja, D.; Tan, L.; Pastor, J. V.; Bennett, M. J. CLN3P, the Batten's disease protein, is a novel palmitoyl-protein Delta-9 desaturase. *Annals of neurology* **2006**, *60* (5), 570.
- (158) Scifo, E.; Sz wajda, A.; Debski, J.; Uusi-Rauva, K.; Kesti, T.; Dadlez, M.; Gingras, A. C.; Tyynela, J.; Baumann, M. H.; Jalanko, A. et al. Drafting the CLN3-Protein interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: a label-free quantitative proteomics approach. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (5), 2101.
- (159) Marheineke, K.; Grünewald, S.; Christie, W.; Reiländer, H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS letters* **1998**, *441* (1), 49.
- (160) Krammer, F.; Schinko, T.; Palmberger, D.; Tauer, C.; Messner, P.; Grabherr, R. *Trichoplusia ni* cells (High FiveTM) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Molecular Biotechnology* **2010**, *45* (3), 226.
- (161) Granados, R. R.; Google Patents, 1994.
- (162) Lumbierres, M.; Palomo, J. M.; Kragol, G.; Roehrs, S.; Muller, O.; Waldmann, H. Solid-phase synthesis of lipidated peptides. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2005**, *11* (24), 7405.
- (163) Ludolph, B.; Eisele, F.; Waldmann, H. Solid-Phase Synthesis of Lipidated Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (21), 5954.
- (164) Bader, B.; Kuhn, K.; Owen, D. J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J. Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature* **2000**, *403* (6766), 223.
- (165) Binnig, G.; Rohrer, H. Geburt und Kindheit der Rastertunnelmikroskopie. *Physik Journal* **1987**, *43* (7), 282.
- (166) Weise, K.; Triola, G.; Brunsveld, L.; Waldmann, H.; Winter, R. Influence of the lipidation motif on the partitioning and association of N-Ras in model membrane subdomains. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (4), 1557.
- (167) Vogel, A.; Reuther, G.; Weise, K.; Triola, G.; Nikolaus, J.; Tan, K. T.; Nowak, C.; Herrmann, A.; Waldmann, H.; Winter, R. et al. The lipid modifications of Ras that sense membrane environments and induce local enrichment. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48* (46), 8784.

- (168) Sud, M.; Fahy, E.; Cotter, D.; Brown, A.; Dennis, E. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H., Jr.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D. W. et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (Database issue), D527.
- (169) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 112.
- (170) Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *The Journal of investigative dermatology* **1983**, *80 Suppl*, 44s.
- (171) Hannun, Y. A.; Loomis, C. R.; Merrill, A. H., Jr.; Bell, R. M. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *The Journal of biological chemistry* **1986**, *261* (27), 12604.
- (172) Meyer zu Heringdorf, D.; Jakobs, K. H. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1768* (4), 923.
- (173) Fernandis, A. Z.; Wenk, M. R. Membrane lipids as signaling molecules. *Current opinion in lipidology* **2007**, *18* (2), 121.
- (174) Coant, N.; Sakamoto, W.; Mao, C.; Hannun, Y. A. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in biological regulation* **2017**, *63*, 122.
- (175) Nikolova-Karakashian, M. N.; Rozenova, K. A. Ceramide in stress response. *Advances in experimental medicine and biology* **2010**, *688*, 86.
- (176) Zeidan, Y. H.; Hannun, Y. A. Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends in molecular medicine* **2007**, *13* (8), 327.
- (177) Claus, R. A.; Dorer, M. J.; Bunck, A. C.; Deigner, H. P. Inhibition of sphingomyelin hydrolysis: targeting the lipid mediator ceramide as a key regulator of cellular fate. *Current medicinal chemistry* **2009**, *16* (16), 1978.
- (178) Kitatani, K.; Sheldon, K.; Rajagopalan, V.; Anelli, V.; Jenkins, R. W.; Sun, Y.; Grabowski, G. A.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (19), 12972.
- (179) Cacicedo, J. M.; Benjachareowong, S.; Chou, E.; Ruderman, N. B.; Ido, Y. Palmitate-Induced Apoptosis in Cultured Bovine Retinal Pericytes: Roles of NAD(P)H Oxidase, Oxidant Stress, and Ceramide. *Diabetes* **2005**, *54* (6), 1838.
- (180) Benoit, S. C.; Kemp, C. J.; Elias, C. F.; Abplanalp, W.; Herman, J. P.; Migrenne, S.; Lefevre, A. L.; Cruciani-Guglielmacci, C.; Magnan, C.; Yu, F. et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *The Journal of clinical investigation* **2009**, *119* (9), 2577.
- (181) Contreras, C.; Gonzalez-Garcia, I.; Martinez-Sanchez, N.; Seoane-Collazo, P.; Jacas, J.; Morgan, D. A.; Serra, D.; Gallego, R.; Gonzalez, F.; Casals, N. et al. Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep* **2014**, *9* (1), 366.
- (182) Siddique, M. M.; Li, Y.; Chaurasia, B.; Kaddai, V. A.; Summers, S. A. Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *The Journal of biological chemistry* **2015**, *290* (25), 15371.
- (183) Chaurasia, B.; Summers, S. A. Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2015**, *26* (10), 538.
- (184) Venable, M. E.; Lee, J. Y.; Smyth, M. J.; Bielawska, A.; Obeid, L. M. Role of ceramide in cellular senescence. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270* (51), 30701.
- (185) van Echten-Deckert, G.; Giannis, A.; Schwarz, A.; Futerman, A. H.; Sandhoff, K. 1-Methylthiodihydroceramide, a novel analog of dihydroceramide, stimulates sphinganine degradation resulting in decreased de novo sphingolipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (2), 1184.
- (186) Jarvis, W. D.; Grant, S. The role of ceramide in the cellular response to cytotoxic agents. *Current opinion in oncology* **1998**, *10* (6), 552.
- (187) Sharma, K.; Shi, Y. The yins and yangs of ceramide. *Cell research* **1999**, *9* (1), 1.
- (188) Merrill, G. F.; Kurth, E. J.; Hardie, D. G.; Winder, W. W. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* **1997**, *273* (6 Pt 1), E1107.
- (189) Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 139.
- (190) Geilen, C. C.; Wieder, T.; Orfanos, C. E. Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Archives of dermatological research* **1997**, *289* (10), 559.

- (191) Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Madison, K. C.; Downing, D. T. Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *The Journal of investigative dermatology* **1987**, *89* (4), 419.
- (192) Proksch, E.; Brasch, J. Influence of epidermal permeability barrier disruption and Langerhans' cell density on allergic contact dermatitis. *Acta dermato-venereologica* **1997**, *77* (2), 102.
- (193) Holleran, W. M.; Feingold, K. R.; Man, M. Q.; Gao, W. N.; Lee, J. M.; Elias, P. M. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res* **1991**, *32* (7), 1151.
- (194) Czabotar, P. E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (1), 49.
- (195) Perera, M. N.; Lin, S. H.; Peterson, Y. K.; Bielawska, A.; Szulc, Z. M.; Bittman, R.; Colombini, M. Bax and Bcl-xL exert their regulation on different sites of the ceramide channel. *The Biochemical journal* **2012**, *445* (1), 81.
- (196) Birbes, H.; El Bawab, S.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2001**, *15* (14), 2669.
- (197) Birbes, H.; Luberto, C.; Hsu, Y. T.; El Bawab, S.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax translocation to mitochondria. *The Biochemical journal* **2005**, *386* (Pt 3), 445.
- (198) Dai, Q.; Liu, J.; Chen, J.; Durrant, D.; McIntyre, T. M.; Lee, R. M. Mitochondrial ceramide increases in UV-irradiated HeLa cells and is mainly derived from hydrolysis of sphingomyelin. *Oncogene* **2004**, *23* (20), 3650.
- (199) Matsko, C. M.; Hunter, O. C.; Rabinowich, H.; Lotze, M. T.; Amoscato, A. A. Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *287* (5), 1112.
- (200) Siskind, L. J. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **2005**, *37* (3), 143.
- (201) Mullen, T. D.; Obeid, L. M. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2012**, *12* (4), 340.
- (202) Stiban, J.; Caputo, L.; Colombini, M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res* **2008**, *49* (3), 625.
- (203) Wei, M. C.; Zong, W. X.; Cheng, E. H.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A. J.; Roth, K. A.; MacGregor, G. R.; Thompson, C. B.; Korsmeyer, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* **2001**, *292* (5517), 727.
- (204) Zong, W. X.; Lindsten, T.; Ross, A. J.; MacGregor, G. R.; Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development* **2001**, *15* (12), 1481.
- (205) Siskind, L. J.; Mullen, T. D.; Romero Rosales, K.; Clarke, C. J.; Hernandez-Corbacho, M. J.; Edinger, A. L.; Obeid, L. M. The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (16), 11818.
- (206) Komori, H.; Ichikawa, S.; Hirabayashi, Y.; Ito, M. Regulation of intracellular ceramide content in B16 melanoma cells. Biological implications of ceramide glycosylation. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (13), 8981.
- (207) Lavie, Y.; Cao, H.; Volner, A.; Lucci, A.; Han, T. Y.; Geffen, V.; Giuliano, A. E.; Cabot, M. C. Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272* (3), 1682.
- (208) Siskind, L. J.; Kolesnick, R. N.; Colombini, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (30), 26796.
- (209) Samanta, S.; Stiban, J.; Mangel, T. K.; Colombini, M. Visualization of ceramide channels by transmission electron microscopy. *Biochimica et biophysica acta* **2011**, *1808* (4), 1196.
- (210) Anishkin, A.; Sukharev, S.; Colombini, M. Searching for the molecular arrangement of transmembrane ceramide channels. *Biophys J* **2006**, *90* (7), 2414.
- (211) Megha; Sawatzki, P.; Kolter, T.; Bittman, R.; London, E. Effect of ceramide N-acyl chain and polar headgroup structure on the properties of ordered lipid domains (lipid rafts). *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1768* (9), 2205.
- (212) Pruetz, S. T.; Bushnev, A.; Hagedorn, K.; Adiga, M.; Haynes, C. A.; Sullards, M. C.; Liotta, D. C.; Merrill, A. H., Jr. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res* **2008**, *49* (8), 1621.

- (213) Siskind, L. J.; Davoody, A.; Lewin, N.; Marshall, S.; Colombini, M. Enlargement and contracture of C2-ceramide channels. *Biophys J* **2003**, *85* (3), 1560.
- (214) Pettus, B. J.; Chalfant, C. E.; Hannun, Y. A. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, *1585* (2-3), 114.
- (215) Ganesan, V.; Perera, M. N.; Colombini, D.; Datskovskiy, D.; Chadha, K.; Colombini, M. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2010**, *15* (5), 553.
- (216) Schlesinger, P. H.; Gross, A.; Yin, X. M.; Yamamoto, K.; Saito, M.; Waksman, G.; Korsmeyer, S. J. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (21), 11357.
- (217) Antonsson, B.; Conti, F.; Ciavatta, A.; Montessuit, S.; Lewis, S.; Martinou, I.; Bernasconi, L.; Bernard, A.; Mermod, J. J.; Mazzei, G. et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science (New York, N.Y.)* **1997**, *277* (5324), 370.
- (218) Roucou, X.; Rostovtseva, T.; Montessuit, S.; Martinou, J. C.; Antonsson, B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *The Biochemical journal* **2002**, *363* (Pt 3), 547.
- (219) Siskind, L. J.; Feinstein, L.; Yu, T.; Davis, J. S.; Jones, D.; Choi, J.; Zuckerman, J. E.; Tan, W.; Hill, R. B.; Hardwick, J. M. et al. Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (11), 6622.
- (220) Neise, D.; Graupner, V.; Gillissen, B. F.; Daniel, P. T.; Schulze-Osthoff, K.; Janicke, R. U.; Essmann, F. Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of Bak. *Oncogene* **2008**, *27* (10), 1387.
- (221) von Haefen, C.; Wieder, T.; Gillissen, B.; Starck, L.; Graupner, V.; Dorken, B.; Daniel, P. T. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* **2002**, *21* (25), 4009.
- (222) Kashkar, H.; Wiegmann, K.; Yazdanpanah, B.; Haubert, D.; Kronke, M. Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280* (21), 20804.
- (223) Fleming, A.; Noda, T.; Yoshimori, T.; Rubinsztein, D. C. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature chemical biology* **2011**, *7* (1), 9.
- (224) Pewzner-Jung, Y.; Ben-Dor, S.; Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (35), 25001.
- (225) Venkataraman, K.; Riebeling, C.; Bodennec, J.; Riezman, H.; Allegood, J. C.; Sullards, M. C.; Merrill, A. H., Jr.; Futerman, A. H. Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (38), 35642.
- (226) Mizutani, Y.; Kihara, A.; Igarashi, Y. LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *The Biochemical journal* **2006**, *398* (3), 531.
- (227) Rahmaniyan, M.; Curley, R. W., Jr.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A.; Kravets, J. M. Identification of dihydroceramide desaturase as a direct in vitro target for fenretinide. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286* (28), 24754.
- (228) Deng, X.; Yin, X.; Allan, R.; Lu, D. D.; Maurer, C. W.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Shaham, S.; Kolesnick, R. Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **2008**, *322* (5898), 110.
- (229) Menuz, V.; Howell, K. S.; Gentina, S.; Epstein, S.; Riezman, I.; Fornallaz-Mulhauser, M.; Hengartner, M. O.; Gomez, M.; Riezman, H.; Martinou, J. C. Protection of *C. elegans* from anoxia by HYL-2 ceramide synthase. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *324* (5925), 381.
- (230) Karahatay, S.; Thomas, K.; Koybasi, S.; Senkal, C. E.; Elojeimy, S.; Liu, X.; Bielawski, J.; Day, T. A.; Gillespie, M. B.; Sinha, D. et al. Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): attenuation of C(18)-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis. *Cancer letters* **2007**, *256* (1), 101.
- (231) Koybasi, S.; Senkal, C. E.; Sundararaj, K.; Spassieva, S.; Bielawski, J.; Osta, W.; Day, T. A.; Jiang, J. C.; Jazwinski, S. M.; Hannun, Y. A. et al. Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (43), 44311.

- (232) Saddoughi, S. A.; Garrett-Mayer, E.; Chaudhary, U.; O'Brien, P. E.; Afrin, L. B.; Day, T. A.; Gillespie, M. B.; Sharma, A. K.; Wilhoit, C. S.; Bostick, R. et al. Results of a phase II trial of gemcitabine plus doxorubicin in patients with recurrent head and neck cancers: serum C(1)(8)-ceramide as a novel biomarker for monitoring response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2011**, *17* (18), 6097.
- (233) Sentelle, R. D.; Senkal, C. E.; Jiang, W.; Ponnusamy, S.; Gencer, S.; Selvam, S. P.; Ramshesh, V. K.; Peterson, Y. K.; Lemasters, J. J.; Szulc, Z. M. et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature chemical biology* **2012**, *8* (10), 831.
- (234) Atilla-Gokcumen, G. E.; Muro, E.; Relat-Goberna, J.; Sasse, S.; Bedigian, A.; Coughlin, M. L.; Garcia-Manyes, S.; Eggert, U. S. Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell* **2014**, *156* (3), 428.
- (235) Russell, D. W.; Halford, R. W.; Ramirez, D. M.; Shah, R.; Kotti, T. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* **2009**, *78*, 1017.
- (236) Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* **2009**, *50 Suppl*, S15.
- (237) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157* (1), 255.
- (238) Swaney, J. S.; Chapman, C.; Correa, L. D.; Stebbins, K. J.; Bunday, R. A.; Prodanovich, P. C.; Fagan, P.; Baccei, C. S.; Santini, A. M.; Hutchinson, J. H. et al. A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *British journal of pharmacology* **2010**, *160* (7), 1699.
- (239) Yang, J.; Yamato, M.; Sekine, H.; Sekiya, S.; Tsuda, Y.; Ohashi, K.; Shimizu, T.; Okano, T. Tissue engineering using laminar cellular assemblies. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2009**, *21* (32-33), 3404.
- (240) Guerrero, M.; Urbano, M.; Roberts, E. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015). *Expert opinion on therapeutic patents* **2016**, *26* (4), 455.
- (241) Harizi, H.; Corcuff, J. B.; Gualde, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine* **2008**, *14* (10), 461.
- (242) Samad, T. A.; Sapirstein, A.; Woolf, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in molecular medicine* **2002**, *8* (8), 390.
- (243) Mechoulam, R.; Hanus, L.; Fride, E. Towards cannabinoid drugs--revisited. *Progress in medicinal chemistry* **1998**, *35*, 199.
- (244) Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev* **2011**, *111* (10), 5899.
- (245) Gavin, A. C.; Aloy, P.; Grandi, P.; Krause, R.; Boesche, M.; Marzioch, M.; Rau, C.; Jensen, L. J.; Bastuck, S.; Dumpelfeld, B. et al. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **2006**, *440* (7084), 631.
- (246) Li, X.; Gianoulis, T. A.; Yip, K. Y.; Gerstein, M.; Snyder, M. Extensive in vivo metabolite-protein interactions revealed by large-scale systematic analyses. *Cell* **2010**, *143* (4), 639.
- (247) Niphakis, M. J.; Lum, K. M.; Cognetta, A. B., 3rd; Correia, B. E.; Ichu, T. A.; Olucha, J.; Brown, S. J.; Kundu, S.; Piscitelli, F.; Rosen, H. et al. A Global Map of Lipid-BindinG-Proteins and Their Ligandability in Cells. *Cell* **2015**, *161* (7), 1668.
- (248) Gallego, O.; Betts, M. J.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Maeda, K.; Matetzki, C.; Aguilar-Gurrieri, C.; Beltran-Alvarez, P.; Bonn, S.; Fernandez-Tornero, C.; Jensen, L. J. et al. A systematic screen for protein-lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular systems biology* **2010**, *6*, 430.
- (249) Haberkant, P.; Raijmakers, R.; Wildwater, M.; Sachsenheimer, T.; Brugger, B.; Maeda, K.; Houweling, M.; Gavin, A. C.; Schultz, C.; van Meer, G. et al. In vivo profiling and visualization of cellular protein-lipid interactions using bifunctional fatty acids. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, *52* (14), 4033.
- (250) Hulce, J. J.; Cognetta, A. B.; Niphakis, M. J.; Tully, S. E.; Cravatt, B. F. Proteome-wide mapping of cholesterol-interactinG-Proteins in mammalian cells. *Nature methods* **2013**, *10* (3), 259.
- (251) Gubbens, J.; Ruijter, E.; de Fays, L. E.; Damen, J. M.; de Kruijff, B.; Slijper, M.; Rijkers, D. T.; Liskamp, R. M.; de Kroon, A. I. Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chemistry & biology* **2009**, *16* (1), 3.
- (252) Rowland, M. M.; Gong, D.; Bostic, H. E.; Lucas, N.; Cho, W.; Best, M. D. Microarray analysis of Akt PH domain binding employing synthetic biotinylated analogs of all seven phosphoinositide headgroup isomers. *Chem Phys Lipids* **2012**, *165* (2), 207.
- (253) Thiele, C.; Hannah, M. J.; Fahrenholz, F.; Huttner, W. B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* **2000**, *2* (1), 42.

- (254) Haberkant, P.; Schmitt, O.; Contreras, F. X.; Thiele, C.; Hanada, K.; Sprong, H.; Reinhard, C.; Wieland, F. T.; Brugger, B. Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *J Lipid Res* **2008**, *49* (1), 251.
- (255) Contreras, F. X.; Ernst, A. M.; Haberkant, P.; Bjorkholm, P.; Lindahl, E.; Gonen, B.; Tischer, C.; Elofsson, A.; von Heijne, G.; Thiele, C. et al. Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature* **2012**, *481* (7382), 525.
- (256) Rowland, M. M.; Bostic, H. E.; Gong, D.; Speers, A. E.; Lucas, N.; Cho, W.; Cravatt, B. F.; Best, M. D. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate activity probes for the labeling and proteomic characterization of protein binding partners. *Biochemistry* **2011**, *50* (51), 11143.
- (257) Best, M. D.; Rowland, M. M.; Bostic, H. E. Exploiting bioorthogonal chemistry to elucidate protein-lipid binding interactions and other biological roles of phospholipids. *Accounts of chemical research* **2011**, *44* (9), 686.
- (258) Wang, D.; Du, S.; Cazenave-Gassiot, A.; Ge, J.; Lee, J. S.; Wenk, M. R.; Yao, S. Q. Global Mapping of Protein-Lipid Interactions by Using Modified Choline-Containing Phospholipids Metabolically Synthesized in Live Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56* (21), 5829.
- (259) Kota, V.; Szulc, Z. M.; Hama, H. Identification of C(6) -ceramide-interacting-Proteins in D6P2T Schwannoma cells. *Proteomics* **2012**, *12* (13), 2179.
- (260) Chalfant, C. E.; Rathman, K.; Pinkerman, R. L.; Wood, R. E.; Obeid, L. M.; Ogretmen, B.; Hannun, Y. A. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (15), 12587.
- (261) Perry, D. K.; Carton, J.; Shah, A. K.; Meredith, F.; Uhlinger, D. J.; Hannun, Y. A. Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (12), 9078.
- (262) Lucci, A.; Han, T. Y.; Liu, Y. Y.; Giuliano, A. E.; Cabot, M. C. Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. *International journal of oncology* **1999**, *15* (3), 541.
- (263) Radin, N. S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *The Biochemical journal* **2003**, *371* (Pt 2), 243.
- (264) Senchenkov, A.; Litvak, D. A.; Cabot, M. C. Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *Journal of the National Cancer Institute* **2001**, *93* (5), 347.
- (265) Strum, J. C.; Small, G. W.; Pauig, S. B.; Daniel, L. W. 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (22), 15493.
- (266) Ogretmen, B.; Hannun, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature reviews. Cancer* **2004**, *4* (8), 604.
- (267) Lemonnier, L. A.; Dillehay, D. L.; Vespremi, M. J.; Abrams, J.; Brody, E.; Schmelz, E. M. Sphingomyelin in the suppression of colon tumors: prevention versus intervention. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *419* (2), 129.
- (268) Huang, W. C.; Chen, C. L.; Lin, Y. S.; Lin, C. F. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *Journal of lipids* **2011**, *2011*, 565316.
- (269) Hannun, Y. A. Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. *Advances in experimental medicine and biology* **1997**, *400a*, 305.
- (270) Stover, T. C.; Sharma, A.; Robertson, G. P.; Kester, M. Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11* (9), 3465.
- (271) Huwiler, A.; Brunner, J.; Hummel, R.; Vervoordeldonk, M.; Stabel, S.; van den Bosch, H.; Pfeilschifter, J. Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (14), 6959.
- (272) Zhang, Y.; Yao, B.; Delikat, S.; Bayoumy, S.; Lin, X. H.; Basu, S.; McGinley, M.; Chan-Hui, P. Y.; Lichenstein, H.; Kolesnick, R. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **1997**, *89* (1), 63.
- (273) Abbott, D. E.; Margaryan, N. V.; Jeruss, J. S.; Khan, S.; Kaklamani, V.; Winchester, D. J.; Hansen, N.; Rademaker, A.; Khalkhali-Ellis, Z.; Hendrix, M. J. Reevaluating cathepsin D as a biomarker for breast cancer: serum activity levels versus histopathology. *Cancer biology & therapy* **2010**, *9* (1), 23.
- (274) Deiss, L. P.; Galinka, H.; Berissi, H.; Cohen, O.; Kimchi, A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo j* **1996**, *15* (15), 3861.
- (275) Bourbon, N. A.; Yun, J.; Kester, M. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (45), 35617.
- (276) Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M.; Nishijima, M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **2003**, *426* (6968), 803.

- (277) Mukhopadhyay, A.; Saddoughi, S. A.; Song, P.; Sultan, I.; Ponnusamy, S.; Senkal, C. E.; Snook, C. F.; Arnold, H. K.; Sears, R. C.; Hannun, Y. A. et al. Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23* (3), 751.
- (278) Elsen, L.; Betz, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; van Echten-Deckert, G. Identification of ceramide binding-Proteins in neuronal cells: a critical point of view. *Neurochemical research* **2002**, *27* (7-8), 717.
- (279) Hannun, Y. A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *274* (5294), 1855.
- (280) Hannun, Y. A.; Luberto, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in cell biology* **2000**, *10* (2), 73.
- (281) Dbaibo, G. S.; Perry, D. K.; Gamard, C. J.; Platt, R.; Poirier, G. G.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. Cytokine response modifier A (CrmA) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF)-alpha: CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway. *The Journal of experimental medicine* **1997**, *185* (3), 481.
- (282) Susin, S. A.; Zamzami, N.; Castedo, M.; Daugas, E.; Wang, H. G.; Geley, S.; Fassy, F.; Reed, J. C.; Kroemer, G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **1997**, *186* (1), 25.
- (283) Lee, J. Y.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271* (22), 13169.
- (284) Jung, E. M.; Griner, R. D.; Mann-Blakeney, R.; Bollag, W. B. A potential role for ceramide in the regulation of mouse epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* **1998**, *110* (4), 318.
- (285) Furuya, S.; Mitoma, J.; Makino, A.; Hirabayashi, Y. Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *Journal of neurochemistry* **1998**, *71* (1), 366.
- (286) Heinrich, M.; Wickel, M.; Schneider-Brachert, W.; Sandberg, C.; Gahr, J.; Schwandner, R.; Weber, T.; Saftig, P.; Peters, C.; Brunner, J. et al. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *Embo j* **1999**, *18* (19), 5252.
- (287) Elsen, L.; Betz, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; van Echten-Deckert, G. Identification of Ceramide Binding-Proteins in Neuronal Cells: A Critical Point of View. *Neurochemical research* **2002**, *27* (7), 717.
- (288) Haberkant, P.; Holthuis, J. C. Fat & fabulous: bifunctional lipids in the spotlight. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1841* (8), 1022.
- (289) Haberkant, P.; Stein, F.; Hoglinger, D.; Gerl, M. J.; Brugger, B.; Van Veldhoven, P. P.; Krijgsveld, J.; Gavin, A. C.; Schultz, C. Bifunctional Sphingosine for Cell-Based Analysis of Protein-Sphingolipid Interactions. *ACS Chem Biol* **2016**, *11* (1), 222.
- (290) Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, *9* (11), 883.
- (291) Garrido, M.; Abad, J. L.; Fabrias, G.; Casas, J.; Delgado, A. Azide-tagged sphingolipids: new tools for metabolic flux analysis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, *16* (4), 641.
- (292) Levy, M.; Futerman, A. H. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB life* **2010**, *62* (5), 347.
- (293) Jin, J.; Hou, Q.; Mullen, T. D.; Zeidan, Y. H.; Bielawski, J.; Kravka, J. M.; Bielawska, A.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A.; Hsu, Y. T. Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondria in NT-2 cells. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (39), 26509.
- (294) Herold, P. Synthesis of D-Erythro- and D-Threo-Sphingosine Derivatives From L-Serine. *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71* (2), 354.
- (295) Huang da, W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* **2009**, *4* (1), 44.
- (296) Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Database issue), D109.
- (297) Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Many ceramides. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286* (32), 27855.
- (298) Yao, J. Z.; Uttamapinant, C.; Poloukhtine, A.; Baskin, J. M.; Codelli, J. A.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R.; Popik, V. V.; Ting, A. Y. Fluorophore targeting to cellular proteins via enzyme-mediated azide ligation and strain-promoted cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (8), 3720.

- (299) Oka, Y.; Varmark, H.; Vitting-Seerup, K.; Beli, P.; Waage, J.; Hakobyan, A.; Mistrik, M.; Choudhary, C.; Rohde, M.; Bekker-Jensen, S. et al. UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO reports* **2014**, *15* (9), 956.
- (300) Thijssen, V. L.; Heusschen, R.; Caers, J.; Griffioen, A. W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1855* (2), 235.
- (301) Hangen, E.; De Zio, D.; Bordi, M.; Zhu, C.; Dessen, P.; Caffin, F.; Lachkar, S.; Perfettini, J. L.; Lazar, V.; Benard, J. et al. A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. *Cell death and differentiation* **2010**, *17* (7), 1155.
- (302) Scharstuhl, A.; Mutsaers, H. A.; Pennings, S. W.; Russel, F. G.; Wagener, F. A. Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis. *PLoS one* **2009**, *4* (8), e6688.
- (303) Susin, S. A.; Lorenzo, H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **1999**, *397* (6718), 441.
- (304) Jazvinscak Jembrek, M.; Hof, P. R.; Simic, G. Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and Abeta Accumulation. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2015**, *2015*, 346783.
- (305) Walter, J.; van Echten-Deckert, G. Cross-talk of membrane lipids and Alzheimer-related proteins. *Molecular neurodegeneration* **2013**, *8*, 34.
- (306) Ogretmen, B.; Kraveka, J. M.; Schady, D.; Usta, J.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (35), 32506.
- (307) Sebbag-Sznajder, N.; Raitskin, O.; Angenitzki, M.; Sato, T. A.; Sperling, J.; Sperling, R. Regulation of alternative splicing within the supraspliceosome. *Journal of structural biology* **2012**, *177* (1), 152.
- (308) Breuza, L.; Halbeisen, R.; Jenö, P.; Otte, S.; Barlowe, C.; Hong, W.; Hauri, H. P. Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cyclinG-Protein that interacts with human Erv46. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (45), 47242.
- (309) Luirink, J.; Samuelsson, T.; de Gier, J. W. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS letters* **2001**, *501* (1), 1.
- (310) Liu, F. T.; Rabinovich, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* **2005**, *5* (1), 29.
- (311) Harvald, E. B.; Olsen, A. S.; Faergeman, N. J. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2015**, *20* (5), 658.
- (312) Bellizzi, J. J., 3rd; Widom, J.; Kemp, C.; Lu, J. Y.; Das, A. K.; Hofmann, S. L.; Clardy, J. The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (9), 4573.
- (313) Cutler, R. G.; Kelly, J.; Storie, K.; Pedersen, W. A.; Tammara, A.; Hatanpaa, K.; Troncoso, J.; Mattson, M. P. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *PNAS* **2004**, *101* (7), 2070.
- (314) Kumagai, K.; Yasuda, S.; Okemoto, K.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (8), 6488.
- (315) Savitski, M. M.; Reinhard, F. B.; Franken, H.; Werner, T.; Savitski, M. F.; Eberhard, D.; Martinez Molina, D.; Jafari, R.; Dovega, R. B.; Klaeger, S. et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science (New York, N.Y.)* **2014**, *346* (6205), 1255784.
- (316) Freire, E.; Schon, A.; Velazquez-Campoy, A. Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials. *Methods in enzymology* **2009**, *455*, 127.
- (317) Ladbury, J. E. Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design. *Biochemical Society transactions* **2010**, *38* (4), 888.
- (318) Abdiche, Y.; Malashock, D.; Pinkerton, A.; Pons, J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Analytical biochemistry* **2008**, *377* (2), 209.
- (319) Vivoli, M.; Novak, H. R.; Littlechild, J. A.; Harmer, N. J. Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* **2014**, DOI:10.3791/51809 10.3791/51809(91), 51809.

-
- (320) Scott, D. E.; Ehebauer, M. T.; Pukala, T.; Marsh, M.; Blundell, T. L.; Venkitaraman, A. R.; Abell, C.; Hyvönen, M. Using a Fragment-Based Approach To Target Protein–Protein Interactions. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2013**, *14* (3), 332.
- (321) Mejuch, T.; van Hattum, H.; Triola, G.; Jaiswal, M.; Waldmann, H. Specificity of Lipoprotein Chaperones for the Characteristic Lipidated Structural Motifs of their Cognate Lipoproteins. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, *16* (17), 2460.
- (322) Patil, R.; Laguerre, A.; Wielens, J.; Headey, S. J.; Williams, M. L.; Hughes, M. L. R.; Mohanty, B.; Porter, C. J. H.; Scanlon, M. J. Characterization of Two Distinct Modes of Drug Binding to Human Intestinal Fatty Acid Binding-Protein. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9* (11), 2526.
- (323) Wan, J.; Roth, A. F.; Bailey, A. O.; Davis, N. G. Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat. Protocols* **2007**, *2* (7), 1573.
- (324) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. Convenient Procedures for the Synthesis of N-BOC-D-Serinal Acetonide from L-Serine. *Synthesis* **1997**, *1997* (10), 1146.

12 Anhang

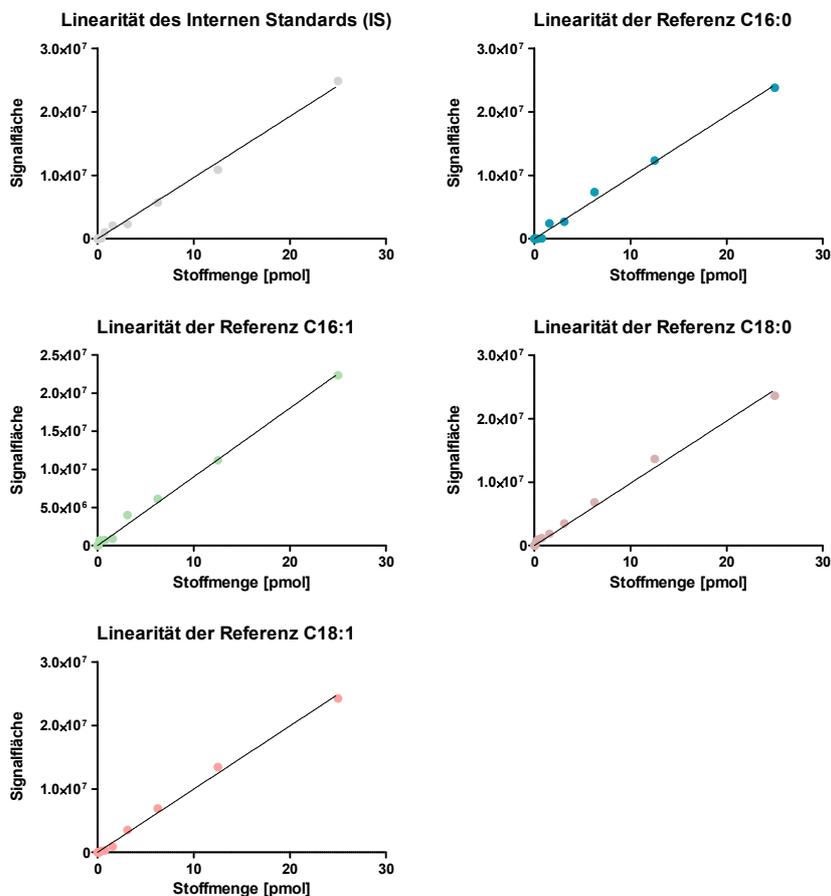


Abbildung 74: Bestimmung des linearen Verhaltens exemplarisch für vier Referenzen (Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1)) und dem Internen Standard (C17:0, IS). Serielle Verdünnung der jeweiligen Substanz (25-0.01 pmol) und Auftragung der Signalfächen gegen die Stoffmenge.

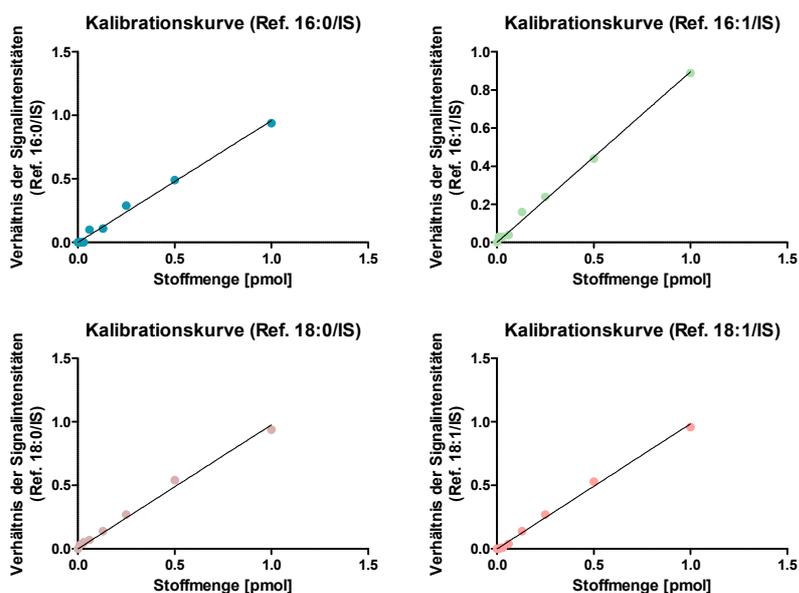


Abbildung 75: Graphische Darstellung der vier Kalibrationskurven. Serielle Verdünnung (25-0.01 pmol) der vier Referenzen (Palmitoyl (16:0), Palmitolein (16:1), Stearyl (18:0), Oleoyl (18:1)) und Zugabe des Internen Standards (C17:0, 25 pmol) in

bekannter und gleichbleibender Konzentration. Auftragung des Verhältnisses der relativen Intensitäten der Referenz gegenüber dem Signal des IS.

Tabelle 9: Überblick der finalen Liste der 214 im PD identifizierten Proteine.

Protein	Name
Abhd12	Monoacylglycerol lipase ABHD12
Acads	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Acbd5	Acyl-CoA-binding domain-containing-Protein 5
Acin1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus
Acp1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase
Acs16	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6
Agk	Acylglycerol kinase, mitochondrial
Agpat5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon
Aifm1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial
Aifm2	Apoptosis-inducing factor 2
Aldh3a2	Aldehyde dehydrogenase; Fatty aldehyde dehydrogenase
Aldh3b1	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1
Aldh7a1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase
Alg2	Alpha-1,3/ 1,6-mannosyltransferase ALG2
Anapc7	Anaphase-promoting complex subunit 7
Api5	Apoptosis inhibitor 5
Apob	Apolipoprotein B-100; Apolipoprotein B-48
APP	Amyloid beta A4 protein; N-APP
Arl1	ADP-ribosylation factor-like protein 1
Arl8a	ADP-ribosylation factor-like protein 8A
Arl8b	ADP-ribosylation factor-like protein 8B
Asah1	Acid ceramidase; Acid ceramidase subunit alpha; beta
Atad2	ATPase family AAA domain-containing-Protein 2
Atad2b	MKIAA1240 protein
Atp13a1	Manganese-transporting ATPase 13A1
Atp5e	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial
Atp5l	ATP synthase subunit g, mitochondrial
Bax	Apoptosis regulator BAX
Bcas2	Pre-mRNA-splicing factor SPF27
Bcl-xL	Bcl-2-like protein 1
Bcl2l13	Bcl-2-like protein 13
Bclaf1	Bcl-2-associated transcription factor 1
Bik	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing-Protein 5
Bud31	Protein Bud31 homolog
Bysl	Bystin
Cand2	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 2
Cbr1	Carbonyl reductase [NADPH] 1

Cdk5	Cyclin-dependent-like kinase 5
Cdk5rap2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
Celf1	CUGBP Elav-like family member 1
Celf4	CUGBP Elav-like family member 4
Cers2	Ceramide synthase 2
Cers4	Ceramide synthase 4
Chd7; Chd6; Chd9	Chromodomain-helicase-DNA-binding-Protein 7; 6; 9
Cog7	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7
Coq9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial
Cpsf3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3
Cpt2	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial
Csnk1e; Csnk1d	Casein kinase I isoform epsilon; Casein kinase I isoform delta
Ctps1	CTP synthase 1
Ctsb	Cathepsin B; Cathepsin B light chain; Cathepsin B heavy chain
Cyc1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
Dazap1	DAZ-associated protein 1
Dcakd	Dephospho-CoA kinase domain-containing-Protein
Ddx23	Protein Ddx23
Ddx24	ATP-dependent RNA helicase DDX24
Ddx54	ATP-dependent RNA helicase DDX54
Degs1	Sphingolipid delta (4)-desaturase DES1
Desi1	Desumoylating isopeptidase 1
Dhx36	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Ecm29; AI314180	Proteasome-associated protein ECM29 homolog
Eif1; Eif1b	Eukaryotic translation initiation factor 1b
Emc8	ER membrane protein complex subunit 8
Erap1	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
Ergic1	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1
Erh	Enhancer of rudimentary homolog
Exoc5	Exocyst complex component 5
Fads1	Fatty acid desaturase 1
Fads2	Fatty acid desaturase 2
Fam162a	Protein FAM162A
Fam208b	Protein FAM208B
Fam210a	Protein FAM210A
Gbf1	Prostaglandin E synthase 2
Gemin5	Gem-associated protein 5
Gfpt1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
Gga2	ADP-ribosylation factor-binding-Protein GGA2
Ghdc	GH3 domain-containing-Protein
Glipr2	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1
Glmn	Glomulin
Glyr1	Putative oxidoreductase GLYR1

Gnai1; Gnai3; Gnai2	Guanine nucleotide-bindinG-Protein G(i/k) subunit alpha-1
Gnpat	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
Golga5	Golgin subfamily A member 5
Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial
Gpx4	Glutathione peroxidase; Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
Hccs	Cytochrome c-type heme lyase
Htra2	Serine protease HTRA2, mitochondrial
ldh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
llvbl	Acetolactate synthase-like protein
Imp4	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4
Impa1	Inositol monophosphatase 1
Incenp	Inner centromere protein
Ing4	Inhibitor of growth protein 4
Ing5	Inhibitor of growth protein 5
Ints4	Integrator complex subunit 4
Itga1	Integrin alpha-1
Kpna1; Kpna6	Importin subunit alpha-5, N-terminally processed
Kras	GTPase KRas; GTPase KRas, N-terminally processed
Lars2	Probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial
LASS2	LAG1 homolog, Ceramide synthase 2
LASS4	LAG1 homolog, Ceramide synthase 4
LASS6	LAG1 homolog, Ceramide synthase 6
Lgals1	Galectin-1
Lgals3	Galectin-3
Lrif1	Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1
Ltn1	E3 ubiquitin-protein ligase listerin
Lypla1	Acyl-protein thioesterase 1
Lyplal1	Lysophospholipase-like protein 1
Maged1	Melanoma-associated antigen D1
Mccc1	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial
Mcu	Calcium uniporter protein, mitochondrial
Meaf6	Chromatin modification-related protein MEAF6
Mif	Macrophage migration inhibitory factor
Mlec	Malectin
Mon2	Protein MON2 homolog
Mospd2	Motile sperm domain-containsG-Protein 2
Mpc2	Mitochondrial pyruvate carrier 2
Mphosph8	M-phase phosphoprotein 8
Mrpl47	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
Mtch2	Mitochondrial carrier homolog 2
Mtor	Serine/threonine-protein kinase mTOR
Mtx1	Metaxin-1
Mtx2	Metaxin-2

Mxra7	Matrix-remodeling-associated protein 7
Mycbp	C-Myc-binding-Protein
Myg1	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial
Myl12b	Myosin regulatory light chain 12B
Myo1c	Unconventional myosin-1c
Napa	Alpha-soluble NSF attachment protein
Nceh1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1
Ncoa5	Nuclear receptor coactivator 5
Ndc1	Nucleoporin NDC1
Ndufa4	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4
Ndufa7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7
Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
Ndufc2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2
Ndufs5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5
Nfxl1	Nfxl1 protein
Nol8	Nucleolar protein 8
Nop9	Nucleolar protein 9
Nras; Hras	GTPase NRas; GTPase HRas; GTPase HRas, N-terminally processed
Nsun5	Probable 28S rRNA (cytosine-C (5))-methyltransferase
Nubpl	Iron-sulfur protein NUBPL
Nup155	Nuclear pore complex protein Nup155
Nup85	Nuclear pore complex protein Nup85
Nusap1	Nucleolar and spindle-associated protein 1
Oxa1l	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L
Pa2g4	Proliferation-associated protein 2G4
Pam16	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16
Pbrm1	Protein polybromo-1
Pcnt	Pericentrin
Pdxk	Pyridoxal kinase
Pebp1	Phosphatidylethanolamine-binding-Protein 1
Pfn2	Profilin-2; Profilin
Phf14	PHD finger protein 14
Phip	PH-interacting-Protein
Plrg1	Pleiotropic regulator 1
Pmpca	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha
Ppan	Suppressor of SWI4 1 homolog
Pphln1	Periphilin-1
Ppig	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Ppox	Protoporphyrinogen oxidase
Ppp2r1b	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta
Ppp2r5a	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Prdx5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial

Prkar2b	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
Prpf38a	Pre-mRNA-splicing factor 38A
Psmg2	Proteasome assembly chaperone 2
Psph	Phosphoserine phosphatase
Ptar1	Protein Ptar1
Ptges2	Prostaglandin E synthase 2; Prostaglandin E synthase 2 truncated form
Ptpn1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
Rae1	mRNA export factor
Rala	Ras-related protein Ral-A
Rars2	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial
Rfc2	Replication factor C subunit 2
Rngtt	mRNA-capping enzyme; Polynucleotide 5-triphosphatase
Rpl18a	60S ribosomal protein L18a
Rpl37a	60S ribosomal protein L37a
Rps29; Gm10126	40S ribosomal protein S29
Rtca; RtcA	RNA 3-terminal phosphate cyclase
Sar1b	GTP-binding-Protein SAR1b
Sdcbp	Syntenin-1
Sec14l1	SEC14-like protein 1
Sec24c	Protein transport protein Sec24A
Sec24d	Protein Sec24d
Sec62	Translocation protein SEC62
Sgpl1	Sphingosine-1-phosphate lyase 1
Slc1a4	Neutral amino acid transporter A
Slc1a5	Neutral amino acid transporter B(0)
Smpd3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3
Smpd4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4
Snap25	Synaptosomal-associated protein 25
Snrpd1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
Snx8	Sorting nexin-8
Spcs3	Signal peptidase complex subunit 3
Spg7	Paraplegin
Spryd7	SPRY domain-containing-Protein 7
Srrm1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1
Sun1	SUN domain-containing-Protein 1
Tamm41	Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial
Tbc1d15	TBC1 domain family member 15
Tbl2	Transducin beta-like protein 2
Tcf20	Transcription factor 20
Tfip11	Tuftelin-interacting-Protein 11
Tmed4	Transmembrane emp24 domain-containing-Protein 4
Tmem263	Transmembrane protein 263
Tmpo	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta

Tmx4	Thioredoxin-related transmembrane protein 4
Tnpo3	Transportin-3
Top2b	DNA topoisomerase 2-beta
Tor1aip1	Torsin-1A-interactinG-Protein 1
Tor1b	Torsin-1B
Tor3a	Torsin-3A
Trim32	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32
Trip12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Trmt1l	TRMT1-like protein
Trmt2a	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A
Ttc39b	Tetratricopeptide repeat protein 39B
Tuba1b; Tuba4a	Tubulin alpha-1B chain; Tubulin alpha-4A chain
Tubb6	Tubulin beta-6 chain
Tubgcp3	Gamma-tubulin complex component 3
Ube3c	Ubiquitin-protein ligase E3C
Ubl5; Gm16381	Ubiquitin-like protein 5
Ubxn4	UBX domain-containinG-Protein 4
Uchl5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
Uqcc2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2
Utp20	Small subunit processome component 20 homolog
Utp6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog
Xrcc1	DNA repair protein XRCC1

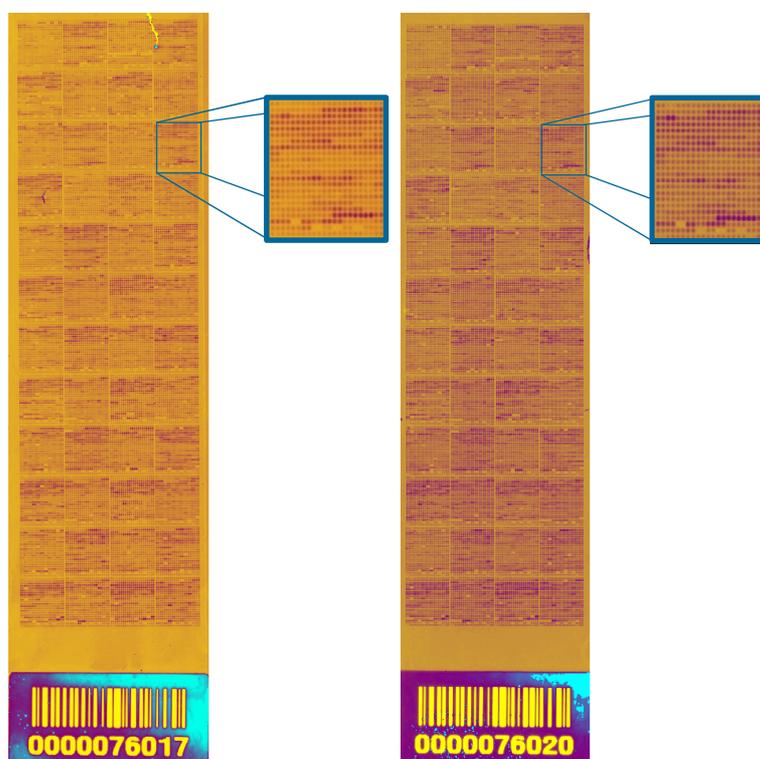


Abbildung 76: Scan der Mikroarrays mit dem Typhoon®-Mikroarray Scanner; Absorption: 545nm und Emission: 567nm. Links: Azido-Dihydroceramid. Rechts: Azido-Ceramid.

Tabelle 10: Überblick der 127 im Mikroarray identifizierten Proteine.

Protein	Name
ABHD1	Abhydrolase domain-containing-Protein 1
ABHD10	abhydrolase domain containing 10 (ABHD10)
ACAT1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)
ACBD7	acyl-Coenzyme A binding domain containing 7 (ACBD7)
ACOT11	Acyl-CoA thioesterase 11 (ACOT11), transcript variant 1, mRNA
ACOT4	Acyl-coenzyme A thioesterase 4
ACP1	acid phosphatase 1, soluble (ACP1), transcript variant 1
ACSBG1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1
AIFM2	Apoptosis-inducing factor 2
AIFM3	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3 (AIFM3)
ALDH3B1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 (ALDH3B1), transcript variant 2, mRNA
APOA1BP	apolipoprotein A-I binding-Protein (APOA1BP)
APOA2	apolipoprotein A-II (APOA2)
APOA4	Apolipoprotein A-IV
APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C (APOBEC3C)
APOBEC3H	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3H (APOBEC3H)
APOC4	apolipoprotein C-IV (APOC4)
APOF	Apolipoprotein F
APOL2	Apolipoprotein L2
APOL3	Apolipoprotein L, 3 (APOL3), transcript variant alpha/a, mRNA
APOL6	apolipoprotein L, 6 (APOL6)
APOM	apolipoprotein M (APOM)
APOOL	apolipoprotein O-like (APOOL)
APP	amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease) (APP)
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C (ARL4C)
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1 (ASAH1), transcript variant 1
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1, mRNA, complete cds
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11), transcript variant 3
BCL2L12	Bcl-2-related proline-rich protein
BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator) (BCL2L14), transcript variant 1
BCL2L2	BCL-W / BCL2L2 Protein (His Tag)
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing) (BIK)
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5), transcript variant 1
BUD31	BUD31 homolog (S. cerevisiae) (BUD31)
C2orf28	Apoptosis-related protein 3
CDK5	cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and p25: CDK5 and p25 sequences are separated
CDK6	Cell division protein kinase 6
CDK7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)
CDKL1	Cyclin-dependent kinase-like 1
CERS1	LAG1 homolog, ceramide synthase 1 (S. cerevisiae), mRNA (cDNA clone), complete cds
COQ6	coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (S. cerevisiae) (COQ6), transcript variant 2

COQ9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial
ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1
FAAH2	fatty acid amide hydrolase 2 (FAAH2)
FABP3	fatty acid binding-Protein 3, muscle and heart
FADS2	fatty acid desaturase 2 (FADS2)
FRAP1 (mTOR)	serine/threonine kinase
GABRA3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3 (GABRA3)
GABRA6	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6 (GABRA6), mRNA
GALNT10	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10
GALNT13	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13
GDPD5	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5)
GPX4	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase) (GPX4)
HEATR2	HEAT repeat containing 2 (HEATR2)
ICMT	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT), transcript variant 2, mRNA
IPO11	importin 11 (IPO11)
IPO4	Importin-4
IPO9	Importin-9
LAPTM4A	lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha
LAPTM5	Lysosomal-associated multispinning membrane protein-5, mRNA
LAS1L	LAS1-like (<i>S. cerevisiae</i>) (LAS1L)
LASS4	LAG1 homolog, ceramide synthase 4 (LASS4)
LASS6	LAG1 homolog, ceramide synthase 6, mRNA (cDNA clone), complete cds.
LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1) (LGALS1)
LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14 (LGALS14)
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (LGALS2)
LGALS3	Galectin-3
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (LGALS3)
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (LGALS3)
LGALS3	LGALS3 / Galectin-3 Protein (Native)
LYPLA2	lysophospholipase II (LYPLA2)
LYPLAL1	lysophospholipase-like 1 (LYPLAL1)
MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha, transcript variant 1
MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha, transcript variant 2
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MARK2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 3
MAT1A	methionine adenosyltransferase I, alpha (MAT1A)
MYCBP	c-myc binding-Protein (MYCBP)
Myg1	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial
MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast (MYL1), transcript variant 3f
MyI12b	Myosin regulatory light chain 12B
MYLC2PL	myosin light chain 2, precursor lymphocyte-specific (MYLC2PL)
MYLK	myosin light chain kinase
MYLK	myosin, light polypeptide kinase (MYLK), transcript variant 5

MYLK2	myosin light chain kinase 2, skeletal muscle (MYLK2)
Myo1c	Unconventional myosin-Ic
Napa	Alpha-soluble NSF attachment protein
Nceh1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1
Ncoa5	Nuclear receptor coactivator 5
Ndc1	Nucleoporin NDC1
Ndufa4	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4
Ndufa7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7
Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
Ndufc2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2
Ndufs5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5
Nfxl1	Nfxl1 protein
Nol8	Nucleolar protein 8
Nop9	Nucleolar protein 9
Nras; Hras	GTPase NRas; GTPase HRas; GTPase HRas, N-terminally processed
Nsun5	Probable 28S rRNA (cytosine-C (5))-methyltransferase
Nubpl	Iron-sulfur protein NUBPL
Nup155	Nuclear pore complex protein Nup155
Nup85	Nuclear pore complex protein Nup85
Nusap1	Nucleolar and spindle-associated protein 1
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1
OXA1L	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L
Oxa1l	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L
Pa2g4	Proliferation-associated protein 2G4
Pam16	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16
Pbrm1	Protein polybromo-1
Pcnt	Pericentrin
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interactinG-Protein (myomegalin) (PDE4DIP)
PDXK	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase (PDXK)
Pdxk	Pyridoxal kinase
Pebp1	Phosphatidylethanolamine-bindinG-Protein 1
Pfn2	Profilin-2; Profilin
PFN4	Profilin-4
Phf14	PHD finger protein 14
Phip	PH-interactinG-Protein
PLA2G15	1-O-acylceramide synthase
PLA2G4C	Zytosolic phospholipase A2 gamma
Plrg1	Pleiotropic regulator 1
Pmpca	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha
Ppan	Suppressor of SWI4 1 homolog
Pphln1	Periphilin-1
Ppig	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

Ppox	Protoporphyrinogen oxidase
Ppp2r1b	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta
Ppp2r5a	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha
PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2), transcript variant 2
PQLC3	PQ loop repeat containing 3 (PQLC3)
Prdx5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial
Prkar2b	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
Prpf38a	Pre-mRNA-splicing factor 38A
Psmg2	Proteasome assembly chaperone 2
Psph	Phosphoserine phosphatase
Ptar1	Protein Ptar1
PTGER3	Prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3) (PTGER3), transcript variant 9, mRNA
PTGES2	prostaglandin E synthase 2 (PTGES2), transcript variant 2
Ptges2	Prostaglandin E synthase 2; Prostaglandin E synthase 2 truncated form
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Ptpn1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
Rae1	mRNA export factor
Rala	Ras-related protein Ral-A
Rars2	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial
Rfc2	Replication factor C subunit 2
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR)
Rngtt	mRNA-capping enzyme; Polynucleotide 5-triphosphatase
Rpl18a	60S ribosomal protein L18a
Rpl37a	60S ribosomal protein L37a
Rps29; Gm10126	40S ribosomal protein S29
Rtca; RtcA	RNA 3-terminal phosphate cyclase
SAR1B	SAR1 gene homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (SAR1B), transcript variant 2
Sar1b	GTP-binding-Protein SAR1b
Sdcbp	Syntenin-1
Sec14l1	SEC14-like protein 1
Sec24c	Protein transport protein Sec24A
Sec24d	Protein Sec24d
Sec62	Translocation protein SEC62
SEPT4	septin 4 (SEPT4), transcript variant 1
SEPT7	septin 7 (SEPT7), transcript variant 1
SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase 1 (SGPL1)
Sgpl1	Sphingosine-1-phosphate lyase 1
Slc1a4	Neutral amino acid transporter A
Slc1a5	Neutral amino acid transporter B(0)
Smpd3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3
Smpd4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4

Snap25	Synaptosomal-associated protein 25
Snrpd1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
Snx8	Sorting nexin-8
Spcs3	Signal peptidase complex subunit 3
Spg7	Paraplegin
SPHK1	sphingosine kinase 1 (SPHK1), transcript variant 1
SPHK1	Sphingosine kinase 1, mRNA (cDNA clone MGC:15041 IMAGE:3831657), complete cds
SPHK2	sphingosine kinase 2 (SPHK2)
Spryd7	SPRY domain-containing-Protein 7
Srrm1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1
SUMO4	Small ubiquitin-related modifier 4
Sun1	SUN domain-containing-Protein 1
Tamm41	Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial
Tbc1d15	TBC1 domain family member 15
TBCEL	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein
Tbl2	Transducin beta-like protein 2
Tcf20	Transcription factor 20
Tfip11	Tuftelin-interacting-Protein 11
Tmed4	Transmembrane emp24 domain-containing-Protein 4
Tmem263	Transmembrane protein 263
Tmpo	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta
Tmx4	Thioredoxin-related transmembrane protein 4
Tnpo3	Transportin-3
Top2b	DNA topoisomerase 2-beta
Tor1aip1	Torsin-1A-interacting-Protein 1
Tor1b	Torsin-1B
Tor3a	Torsin-3A
Trim32	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32
Trip12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Trmt1l	TRMT1-like protein
Trmt2a	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A
Ttc39b	Tetratricopeptide repeat protein 39B
Tuba1b; Tuba4a	Tubulin alpha-1B chain; Tubulin alpha-4A chain
Tubb6	Tubulin beta-6 chain
Tubgcp3	Gamma-tubulin complex component 3
UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1 (UBE1), transcript variant 1
UBE1C	ubiquitin-activating enzyme E1C (UBA3 homolog, yeast) (UBE1C), transcript variant 3
UBE1L	ubiquitin-activating enzyme E1-like (UBE1L)
UBE1L2	ubiquitin-activating enzyme E1-like 2 (UBE1L2)
UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog) (UBE2A)
UBE2B	ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog) (UBE2B)
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C), transcript variant 1
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C), transcript variant 4

UBE2CBP	ubiquitin-conjugating enzyme E2C bindinG-Protein (UBE2CBP), mRNA.
UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A
UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A , transcript variant 2
UBE3C	ubiquitin protein ligase E3C (UBE3C)
Ube3c	Ubiquitin-protein ligase E3C
UBIAD1	UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1)
UBL3	ubiquitin-like 3 (UBL3)
UBL3	Ubiquitin-like protein 3
UBL4A	ubiquitin-like 4A (UBL4A)
UBL5	ubiquitin-like 5 (UBL5), transcript variant 1
Ubl5; Gm16381	Ubiquitin-like protein 5
UBL7	Ubiquitin-like protein 7
Ubxn4	UBX domain-containinG-Protein 4
UchL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
Uqcc2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2
Utp20	Small subunit processome component 20 homolog
Utp6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog
Xrcc1	DNA repair protein XRCC1
YIPF1	Yip1 domain family, member 1 (YIPF1)

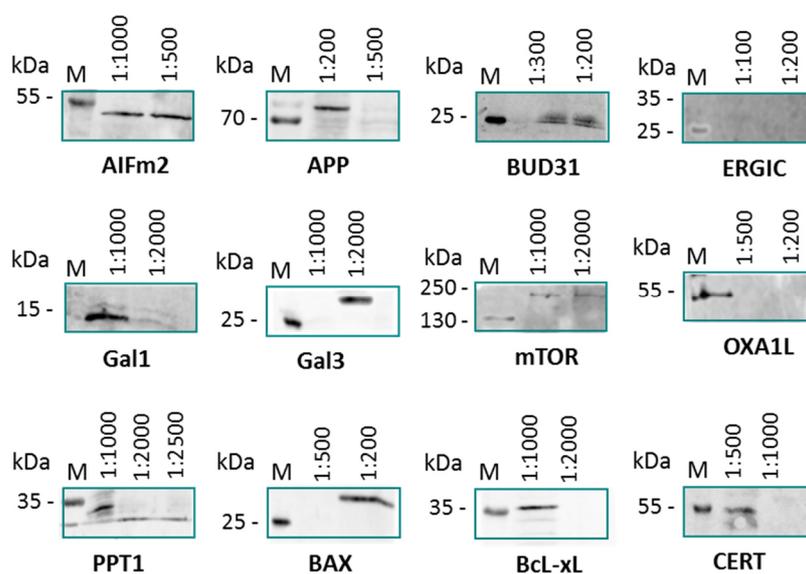


Abbildung 77: Experimentelle Validierung der repräsentativen Zielproteine aus der Isolation der N2a-Lysate mit Ceramid modifizierten DBCO-Kügelchen. Repräsentative Blots aus 5 biologischen Replikaten.

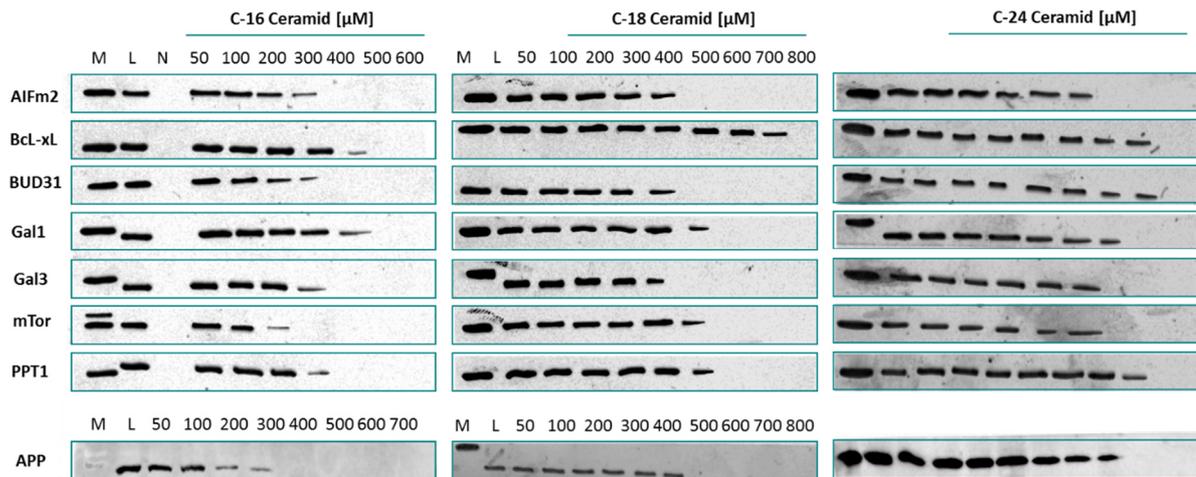


Abbildung 78: Komplette Westernblots der Competitions Experimente mit C-16-, C-18- und C-24-Ceramid. M: Marker; L: Lysat; N: Negativkontrolle. Repräsentative Blots aus 3 biologischen Replikaten.

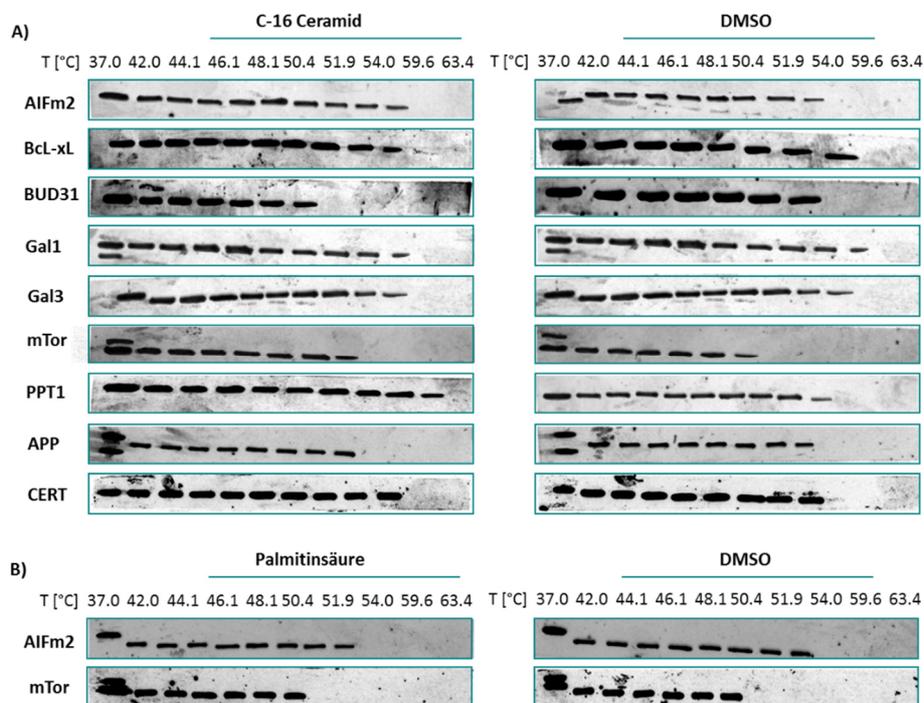


Abbildung 79: A) Komplette Westernblots der Cetsa Experimente mit C-16-Ceramid und DMSO als Kontrolle. Repräsentative Blots aus 3 biologischen Replikaten. B) Komplette Westernblots der Cetsa Experimente mit Palmitinsäure und DMSO als Kontrolle. Repräsentative Blots aus 3 biologischen Replikaten.

13 Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, wodurch mir die Möglichkeit gegeben wurde, in einem hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsumfeld agieren zu können. Des Weiteren möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, die stetige Unterstützung und die wissenschaftliche Freiheit bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Ich danke meiner Betreuerin Dr. Gemma Triola für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Dr. Silke Brand möchte ich ebenfalls für zahlreiche Ideen und Diskussionen hinsichtlich der biologischen Fragestellungen meiner Arbeit danken. Bei PD Dr. Leif Dehmelt möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Dr. Petra Janning, Jens Warmers und dem gesamten HR-MS Team möchte ich für die zahlreichen massenspektrometrischen Messungen und die Auswertung der Proteomanalysen danken. Dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Dr. Waldmann und speziell meinen jetzigen und ehemaligen Büro- und Laborkollegen möchte ich für die langjährige freundschaftliche Atmosphäre danken. Insbesondere möchte ich mich für die Hilfe, Diskussionsbereitschaft und nicht zu vergessen den Spaß in den letzten vier Jahren bedanken, sowohl während der Arbeit, aber auch außerhalb des Instituts.

Weiterer Dank geht an meine Freunde, die mich während meiner Zeit in Dortmund und auch in schwierigen Zeiten immer unterstützt haben. Einen ganz besonderen Dank möchte ich an meine Eltern richten, die mir in jeder Situation meines Lebens zur Seite standen und mich nach allen Möglichkeiten unterstützt haben. Danke Marius, dass du mich in der doch stressigen Zeit ausgehalten hast. Danke für alles!

14 Curriculum Vitae



Janine Schulte-Zweckel

Persönliche Daten

Deutsch, ledig
 13.09.1987 in Bottrop
 Viktoriastraße 29
 52066 Aachen
 Janine@SchulteZweckel.de
 0176 64396799

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
 Englisch (verhandlungssicher)
 Spanisch (Grundkenntnisse)

Veröffentlichungen

“Site-specific, reversible and fluorescent immobilization of proteins on CrAsH-modified surfaces for microarray analytics”
 Chem. Comm. 50 (84), S. 12761-12764 (2014)

“High Affinity Immobilization of Proteins Using the CrAsH/TC Tag”
Molecules, 21(6), 750 (2016)

“Azido-tagged Sphingolipids for the proteome-wide identification of novel C16-ceramide-binding-Proteins”
 (eingereicht, (2017))

“A Bioorthogonal Probe for Quantitative Profiling of Protein S-Acylation”
 (eingereicht, (2017))

Aktuelle Position

09/2017 – heute Eurofins Hygiene Institut Berg
 Vertriebsleiterin, Account Managerin

Ausbildung und Forschungserfahrungen

11/2012 – 07/2017 **Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Technische Universität Dortmund**
Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), Barcelona, Spanien
 Abschluss: Dr. rer. nat. (erwartet 11/2017)
 Doktorvater: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann
 Titel: „Evaluierung der Lipidmuster S-acylierter Proteine Und Azido-Ceramid Derivate zur proteomweiten Identifizierung neuer C16-Ceramid bindender Proteine“

10/2010 - 09/2012 **Technische Universität Dortmund**
 Abschluss: M.Sc. in Chemischer Biologie (1,7)

Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann, Frau Dr. Gemma Triola
 Titel: „Gerichtete Immobilisierung von Peptiden und Proteinen“ (1,0)

10/2007 – 09/2010 **Technische Universität Dortmund**
 Abschluss: B.Sc. in Chemischer Biologie (2,2)

Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann
 Titel: „Synthese einer Peptoid-Peptid-Hybridsequenz des K-Ras4B-C-Terminus“ (1,0)

07/2007 – 08/2007 **E.ON Kraftwerke GmbH, Gelsenkirchen**
 Praktikum, Wasseranalytik und Schmierölzusätze

01/2006 – 04/2006 **Universität Duisburg-Essen**
 Probestudium Physik

08/1998 – 06/2007 **Heinrich-Heine-Gymnasium, Bottrop**
 Abschluss: Abitur (1,7)
 Leistungskurse: Mathematik und Physik

Workshops

IncuCyte™ System ■ Fluorescent Live Cell Imaging in Widefield and Confocal Microscopy (Zeiss Technology) ■ Erste-Hilfe (Grundlehrgang incl. AED) ■ Brandverhütung, abwehrender Brandschutz ■ Waters Separation Day ■ Scrum Master Prep-Course (PSM1) ■ Projektmanagement PMI CAPM Course

Interessen und Hobbies

Rennrad fahren ■ Volleyball ■ Ballsportarten ■ Fitness Studio
 ■ Sportkinder e.V. Dortmund ■ Gitarre spielen ■ Rucksack-Reisen

15 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Schulte-Zweckel, J.; Rosi, F.; Sreenu, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C.; Triola, G.: “Site-specific, reversible and fluorescent immobilization of proteins on CrAsH-modified surfaces for microarray analytics” *Chem. Comm.* 50 (84), S. 12761-12764 (2014)

Schulte-Zweckel, J.; Rosi, F.; Sreenu, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C.; Triola, G.: “High Affinity Immobilization of Proteins Using the CrAsH/TC Tag” *Molecules*, 21(6), 750 (2016)

Schulte-Zweckel, J.; Schneidewind, T; Abad, J.; Brockmeyer, A; Janning, P.; Vetter, I.; Triola, G.: “Azido-tagged Sphingolipids for the proteome-wide identification of novel C16-ceramide-binding-Proteins” (eingereicht, (2017))

J. Schulte-Zweckel, J.; Brockmeyer, A; Janning, P; Dwivedi, M; Winter, R; Triola, G.: “A Bioorthogonal Probe for Quantitative Profiling of Protein S-Acylation” (eingereicht, (2017))