

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Versuchsaufbau

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Themengebiete:

#### Teilprojekt I:

Das Teilprojekt I befasste sich mit der Frage, wie sich der Uracilnucleotidgehalt in verschiedenen Organen Vitamin B6-mangelernährter Ratten zum Zeitpunkt der maximalen Erhöhung der Uracilnucleotide in der Leber verhielt. Die Jungtiere wurden am 21. Tag vom Muttertier getrennt. Die Ernährung der Kontrollgruppe (n = 4) wurde mit vollwertigem Futter, die der Testgruppe (n = 6) mit Vitamin B6-Mangelfutter weitergeführt. Die Organentnahme erfolgte am 35. Tag nach dem Gefrierstop-Verfahren (s.u. 4.2.2.).

#### Teilprojekt II:

Es sollte untersucht werden, inwieweit eine Modifikation der Steroid-vermittelten Genexpression am Anstieg von Uracilnucleotiden und Uracilnucleotidzuckern in der Leber von Vitamin B6-Mangelratten ursächlich beteiligt war. Als Modell für einen absoluten Glucocorticoidmangel wurde eine Gruppe von Mangeltieren (n = 4) und Kontrolltieren (n = 3) am 21. Lebenstag adrenaletomiert und entsprechend den Versuchsgruppen ernährt. In einer zweiten Versuchsgruppe wurde ein Glucocorticoid-Überschuss durch 48-stündige Nahrungskarenz vor der Organentnahme in Mangel- (n = 4) und Kontrolltieren (n = 4) induziert. Die Organentnahme erfolgte am 35. Lebenstag.

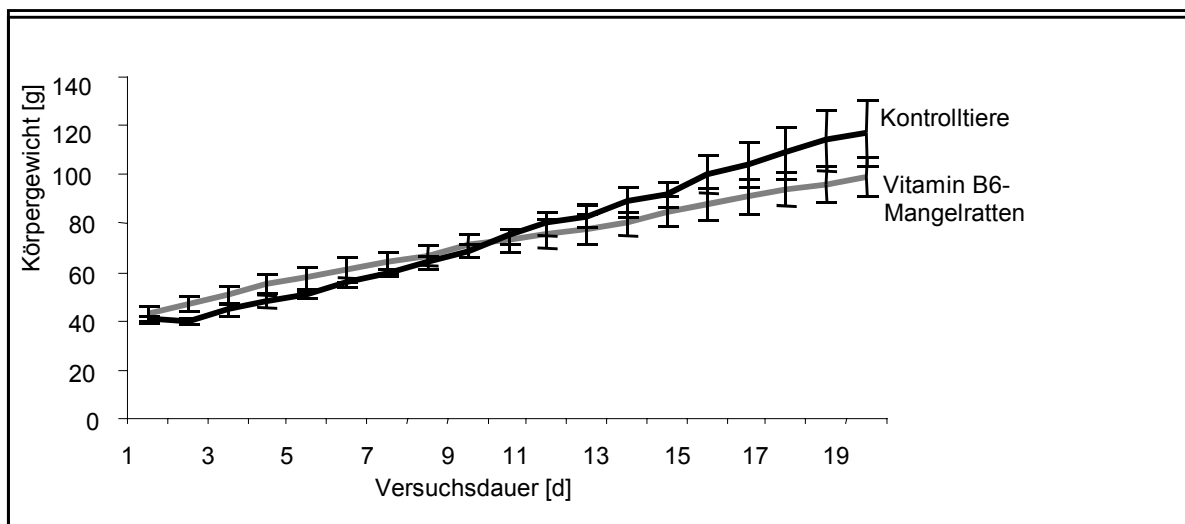
#### Teilprojekt III:

Es sollte die Auswirkung des erhöhten Uracilnucleotid- und Uracilnucleotidzucker-Pools in der Rattenleber auf das Glykosylierungsspektrum von Membranglykoproteinen *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurde zunächst die Untersuchung von Rohmembranaufarbeitungen angestrebt. Nach dem Absetzen am 21. Lebenstag erfolgte die entsprechende Fütterung für 14 Tage, mit anschließender Entnahme der Lebern am 35. Lebenstag. In einem 2. Ansatz wurde zur aufwendigeren Aufarbeitung von Plasmamembranen der Leber übergegangen, da im Rohmembranansatz ein zu hoher Anteil an Glykanvorstufen vermutet werden musste. Die Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen herangezogen wie im Rohmembranansatz. Die Organentnahme erfolgte, wie unter 4.1.4. beschrieben, ebenfalls am 35. Lebenstag.

## 6.2. Versuchstiere

### 6.2.1. Wachstum der Ratten

Das Gewicht der Ratten und die aufgenommene Futtermenge wurden durch tägliches Wiegen ermittelt. Zu Versuchsbeginn betrug das Gewicht der 21 Tage alten Tiere zwischen 39 g und 47 g. Unter einer durchschnittlichen täglichen Nahrungsaufnahme von 8-10 g Vitamin B6-Mangelfutter bzw. vollwertiger Haltungsdiät erfolgte eine Gewichtszunahme auf zuletzt (35. Tag) zwischen 86 g und 132 g. Die durchschnittlich aufgenommene Futtermenge pro Tier und Tag unterschied sich zwischen den Gruppen im gemessenen Zeitraum nicht. In der Arbeit von Renner [41] konnte eine signifikante Wachstumsverzögerung der Vitamin B6-Mangeltiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der 3. Woche der Mangeldiät gezeigt werden. In dem in dieser Arbeit gemessenen Zeitraum ergab sich keine Auswirkung der Vitamin B6-Mangelernährung auf das Wachstum der Tiere, jedoch ist in den letzten Tagen bereits eine Tendenz zur vorbeschriebenen Wachstumsverzögerung der Vitamin B6-mangelernährten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ersichtlich.



**Abb. 10: Wachstum der Ratten unter vollwertiger Haltungsdiät bzw. Vitamin B6-Mangeldiät im Untersuchungszeitraum.** Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 21 Tage alt. Die Testgruppe (n = 6) erhielt Vitamin B6-defizientes Futter, die Kontrollgruppe (n = 4) vollwertige Haltungsdiät. Am 35. Lebenstag erfolgte die Organentnahme.

### **6.2.2. Makroskopische Befunde der entnommenen Organe**

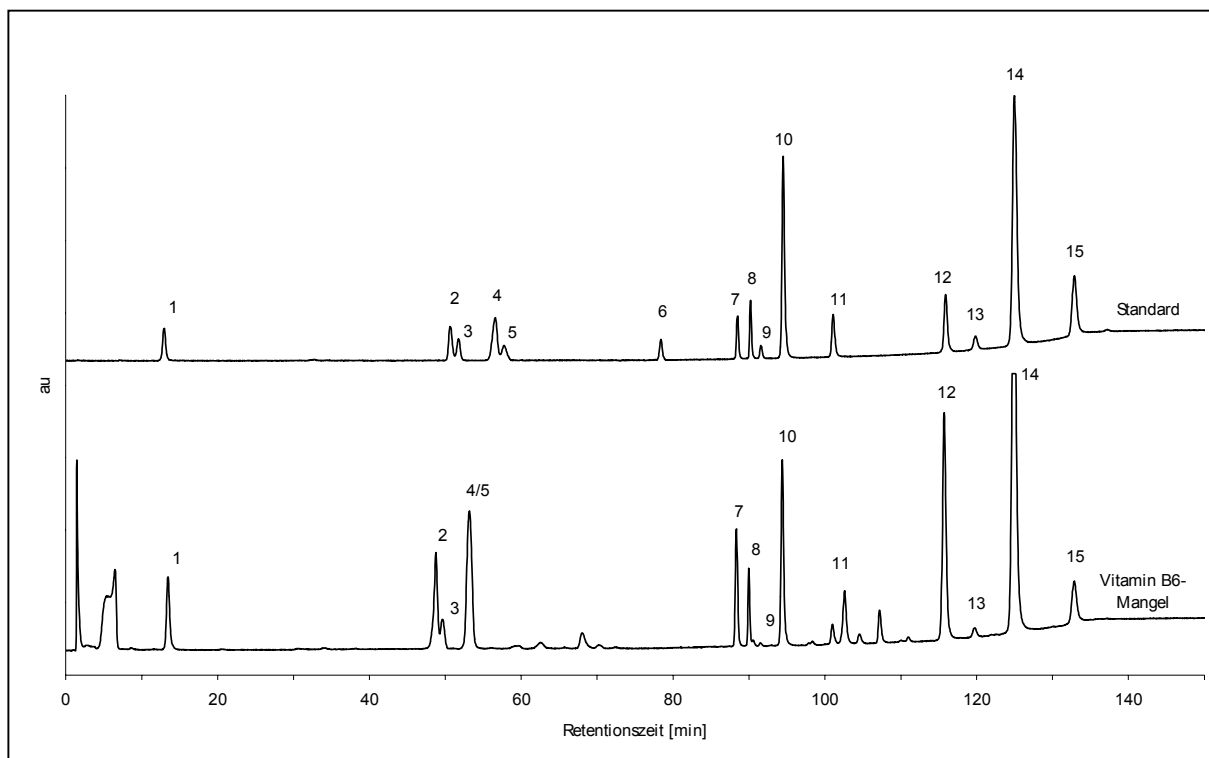
Sowohl die in dieser Arbeit untersuchten Organe Leber, Nieren, Herz, Lungen und Gehirn, als auch die bei Situseröffnung einzusehenden Organe des tiefen Beckens, sowie Magen, Darm und Milz zeigten zu diesem frühen Zeitpunkt keinerlei makroskopische Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe, insbesondere waren keine Substanzdefekte, Ablassungen, Veränderungen der Organkonsistenz oder Größendifferenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe evaluierbar.

### **6.3. Teilprojekt I: Nucleotidkonzentrationen in verschiedenen Organen der Ratte unter Vitamin B6-Mangel**

#### **6.3.1. Konzentrationsbestimmung von 16 Nucleotiden und Nucleotidzuckern mit Anionenaustausch-Chromatographie (SAX-HPLC) und enzymatisch-photometrische Konzentrationsbestimmung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP und UMP in verschiedenen Organen**

Die Organentnahme erfolgte nach der 2. Woche der Vitamin B6-Mangeldiät. Zu diesem Zeitpunkt hatte A. Renner in der Rattenleber eine deutliche Erhöhung der Uracilnucleotid- und Uracilnucleotidzucker-Konzentrationen gezeigt [41]. Die Rattenlebern wurden nach dem Gefrierstop-Verfahren (4.2.2.) entnommen und in Gegenwart von Perchlorsäure homogenisiert und enteiweißt (4.2.3.). Zur Bestimmung von Nucleotiden und Nucleotidzuckern wurden zwei sich ergänzende Methoden verwandt. Die quantitative Bestimmung eines Großteils der Substanzen erfolgte durch chromatographische Auftrennung mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit SAX-HPLC in Anlehnung an die Methode von Pels Rijcken et al. (1990) (s.u. 4.2.6.). Die Nucleotide und Nucleotidzucker wurden dabei über eine Säulenmatrix aus quartären Ammoniumgruppen getrennt. Der Gradient und die Flussrate wurden modifiziert, um eine optimale Trennung der Substanzen, insbesondere von UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc, zu erreichen. Die Di- und Triphosphate der unterschiedlichen Nucleotide konnten mit hoher Präzision voneinander getrennt werden. Vor dem Auftragen auf die Säule wurden die Homogenisate nach einer Modifikation der Methode von Pels Rijcken et al. (1990) (s.u. 4.2.4.) delipidiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der aufgetrennten Nucleotide erfolgte anhand eines externen Standardgemisches. Eine Verlustbestimmung bei Delipidierung erfolgte mittels GDP-<sup>14</sup>C-Fucose als internen Standard

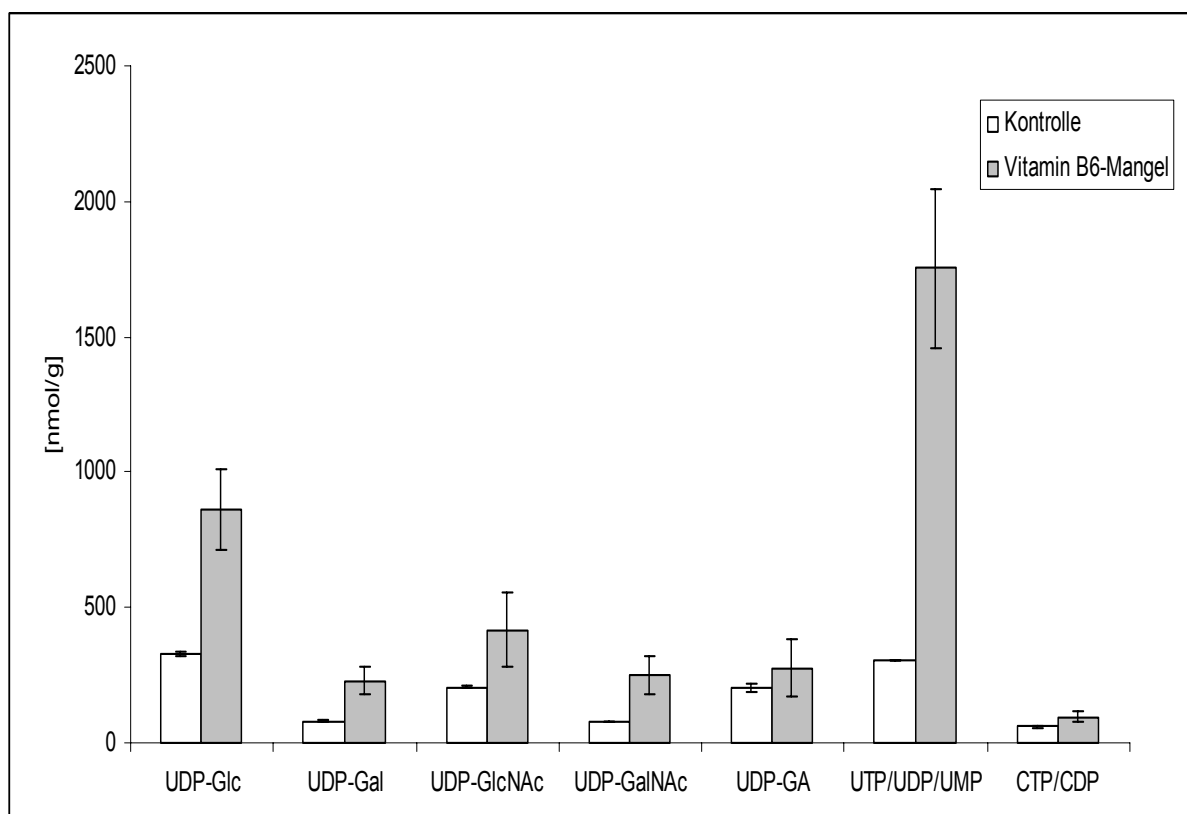
(s.u. 4.2.6.). Durch die Anionenaustausch-Chromatographie wurden folgende Substanzen bestimmt: UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-Xyl, UDP-GA, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UMP, UDP, UTP, CDP, CTP, ADP, ATP, GDP, GTP, GDP-Man. Um eine ausreichende Auflösung der Peaks zu erhalten, wurde die Empfindlichkeit des Detektors so gewählt, dass der Großteil der Substanzen gut dargestellt werden konnte. Aufgrund des vergleichsweise hohen Gehaltes an ATP und ADP lagen die Peaks dieser Substanzen häufig außerhalb des Messbereichs. Um eine hohe Auflösung im Bereich der niedriger konzentrierten Uracilnucleotide zu erhalten, musste auf eine Quantifizierung von ADP und ATP verzichtet werden. Abb. 11 zeigt das Chromatogramm des Leberhomogenates eines Vitamin B6-Mangeltieres im Vergleich zum externen Standard. UDP-Glc und UDP-Gal eluierten aufgrund weitgehender struktureller Ähnlichkeit nahezu gleich (Peak 4), eine ausreichende Trennung war hier durch die Anionenaustausch-Chromatographie nicht zu erreichen. ATP (Peak 14) ist bei optimaler Darstellung der anderen Nucleotide im Chromatogramm des Vitamin B6-Mangel gekappt. Auf eine Quantifizierung musste hier verzichtet werden. Aufgrund der mangelhaften Trennung von UDP-Glc und UDP-Gal durch die SAX-HPLC erfolgte zusätzlich die enzymatisch-photometrische Quantifizierung der Uracilnucleotide UTP, UDP, UMP sowie UDP-Glc und UDP-Gal nach Keppler et al. (1970) (s.u. 4.2.5.).



**Abb. 11: Chromatographische Trennung von Nucleotiden und Nucleotidzuckern mittels Anionenaustausch-Chromatographie (SAX-HPLC).**

(1) Chromatogramm des verwendeten Standards mit 1= UMP, 2= UDP-GlcNAc, 3= UDP-GalNAc, 4= UDP-Glc und UDP-Gal, 5= UDP-Xyl, 6= GDP-Man, 7= UDP, 8= UDP-GA, 9= CDP, 10= ADP, 11= GDP, 12= UTP, 13= CTP, 14= ATP, 15= GTP. (2) Chromatogramm des entweißten, delipidierten Leberhomogenates eines Vitamin B6-Mangeltieres. Die Trennung der Substanzen erfolgte nach dem unter 4.2.6. dargestellten Gradientenprogramm. Die Detektion der eluierten Nucleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Identifizierung der in der Probe enthaltenen Substanzen erfolgte durch den Vergleich mit den Retentionszeiten des definierten Standardgemisches.

Um die bei der Delipidierung unvermeidlichen Verluste an Nucleotiden quantifizieren zu können, wurde den Proben vor Delipidierung eine definierte Menge an GDP-<sup>14</sup>C-Fucose zugefügt. Nach Delipidierung, Einengung und Trennung über die Anionenaustausch-Chromatographie erfolgte im Elutionsbereich der GDP-<sup>14</sup>C-Fucose die Fraktionierung des Eluates, sowie die Messung der Radioaktivität im Szintillator (s.u. 4.2.6.). Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der GDP-<sup>14</sup>C-Fucose konnte über den Verlust an Radioaktivität der Verlust an Nucleotiden und Nucleotidzuckern ermittelt werden. Es konnte von einem anteilig gleichen Verlust ausgegangen werden. Dieser lag im Durchschnitt bei 16,8%.



**Abb. 12: Konzentrationsbestimmung von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP und CDP in Lebergewebe Vitamin B6-mangelernährter Ratten und vollwertig ernährter Kontrolltiere.** Die Ratten waren zu Versuchsbeginn 21 Tage alt und wurden für 14 Tage mit Vitamin B6-freier Kost (n=6) bzw. vollwertiger Haltungskost (n=4) versorgt. Die Organentnahme erfolgte nach dem Gefrierstop-Verfahren. Die Messung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP und UMP erfolgte enzymatisch-photometrisch (s.u. 4.2.5.), alle weiteren Nucleotide und Nucleotidzucker wurden mit Anionenaustausch-HPLC (SAX-HPLC, s.u. 4.2.6.) bestimmt. Im Diagramm sind die Konzentrationen der Nucleotidmono-, -di- und -triphosphate aufgrund des raschen phosphorolytischen Abbaus zusammengefasst.

#### Leber:

Die gemessenen Nucleotidkonzentrationen in der Leber der Kontrolltiere zeigten eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten [83,86]. Unter Vitamin B6-Mangel traten deutliche Konzentrationserhöhungen von UTP, UDP, UMP, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GA, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (s. Abb. 12). Die Summe der UTP-, UDP- und UMP-Konzentrationen zeigte mit einer Konzentrationserhöhung um das 5,8-fache maximale Werte. Neben den Uracilnucleotiden zeigten auch die Summe von CTP und CDP eine signifikante Konzentrationserhöhung um das 1,6-fache unter Vitamin B6-Mangel. Die Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt. Eine Adjustierung nach Holm-

Bonferoni wurde aufgrund der geringen Versuchstierzahlen jedoch nicht durchgeführt. Die GTP- und GDP-Konzentrationen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Aufgrund der an die Uracilnucleotid-Konzentrationen angepassten Detektorempfindlichkeit war eine quantitative Auswertung von ATP und ADP nicht möglich, da diese über der Messbereichsgrenze lagen. Die sowohl mit SAX-HPLC als auch enzymatisch-photometrisch ermittelten Uracilnucleotid-Konzentrationen (UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP, UMP) zeigten eine gute Übereinstimmung. Für die genannten Substanzen war jedoch aufgrund der z.T. ungenügenden Trennung durch die SAX-HPLC die enzymatisch-photometrische Konzentrationsbestimmung überlegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit (s. Tab. 3) bestätigen die von Renner beschriebenen Veränderungen [41]. Die Faktoren der Konzentrationserhöhungen lagen in dieser Arbeit jedoch etwas niedriger. Das Verhältnis von UDP-Glc zu UDP-Gal lag bei Kontrolltieren mit 4,0 und bei Vitamin B6-Mangeltieren mit 3,8 nahe beieinander.

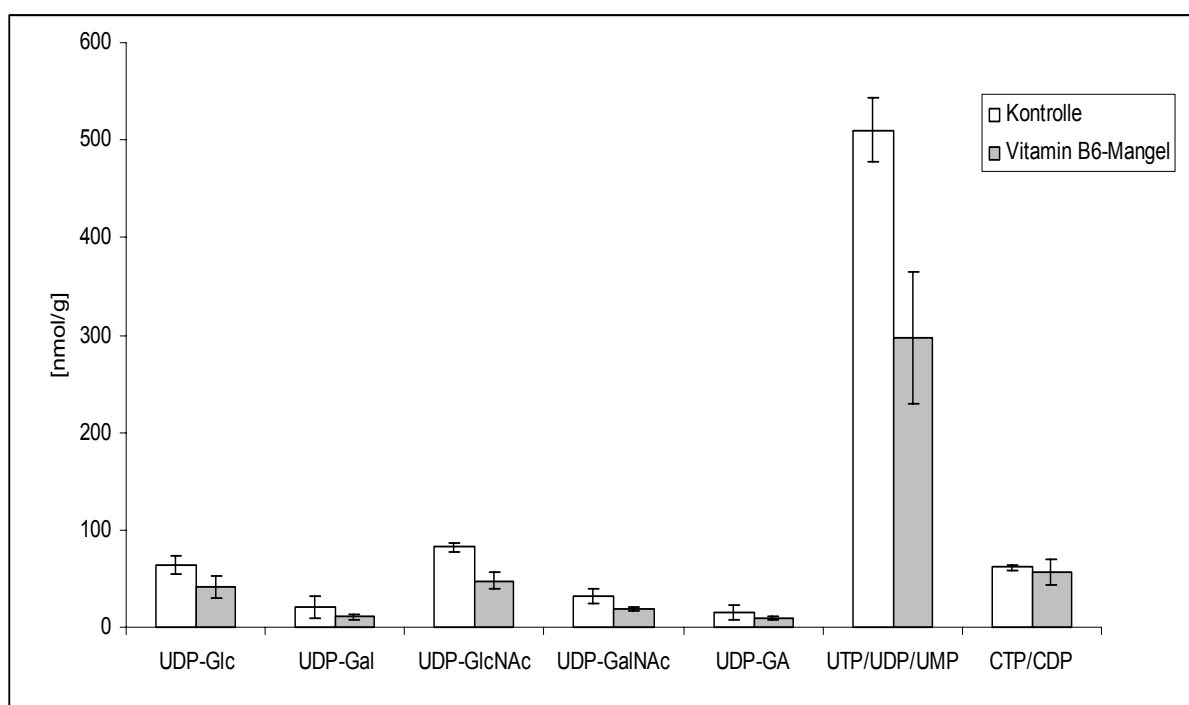
**Tab. 3: Anstieg der Konzentrationen von CTP und CDP, Uracilnucleotiden und Uracilnucleotidzuckern in den Lebern von Vitamin B6-Mangelratten.** Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch (UTP, UDP, UMP, UDP-Glc, UDP-Gal) und mit Anionenaustausch-Chromatographie (UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GA, CTP und CDP).

Substanzen	Faktoren des Konzentrationsanstieges im Vitamin B6-Mangel
∑ UTP, UDP, UMP	5,8 <sup>(1)</sup>
UDP-GlcNAc	2,2 <sup>(1)</sup>
UDP-GalNAc	3,2 <sup>(1)</sup>
UDP-Glc und UDP-Gal	2,7 <sup>(1)</sup>
UDP-GA	1,4 <sup>(1)</sup>
∑ CTP, CDP	1,6 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Signifikanz nach dem Mann-Whitney-Test ( $p \leq 0,046$ )

Herz:

Im Herzmuskel lagen die Nucleotidkonzentrationen der Normaltiere erwartungsgemäß deutlich niedriger als in der Leber. Da bei der Organentnahme nach dem Gefrierstop-Verfahren die Organe nacheinander entnommen wurden, musste davon ausgegangen werden, dass aufgrund der etwas längeren Ischämiezeit in den zuletzt entnommenen Organen bereits ein hydrolytischer Abbau von Nucleotid- und triphosphaten begonnen hatte [82]. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen der Nucleotidmono-, -di- und triphosphate zusammengefasst dargestellt (s. Abb. 13). Unter Vitamin B6-Mangel zeigten die Uracilnucleotid-Konzentrationen im Vergleich zur Rattenleber einen gegenläufigen Effekt. Es zeigte sich eine 40%ige Erniedrigung der Summe der Konzentrationen von UTP, UDP und UMP sowie von UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Glc und UDP-GA. UDP-Gal, CTP/CDP zeigten keine signifikanten Konzentrationsveränderungen (s. Tab. 4). Das Verhältnis von UDP-Glc zu UDP-Gal betrug bei Kontrolltieren 3,0 und bei Vitamin B6-Mangeltieren 3,9. GTP und GDP zeigten keine Veränderungen. Aufgrund der an die Uracilnucleotid-Konzentrationen angepassten Detektorempfindlichkeit war auch hier eine quantitative Auswertung von ATP und ADP nicht möglich (s. a. Leber).

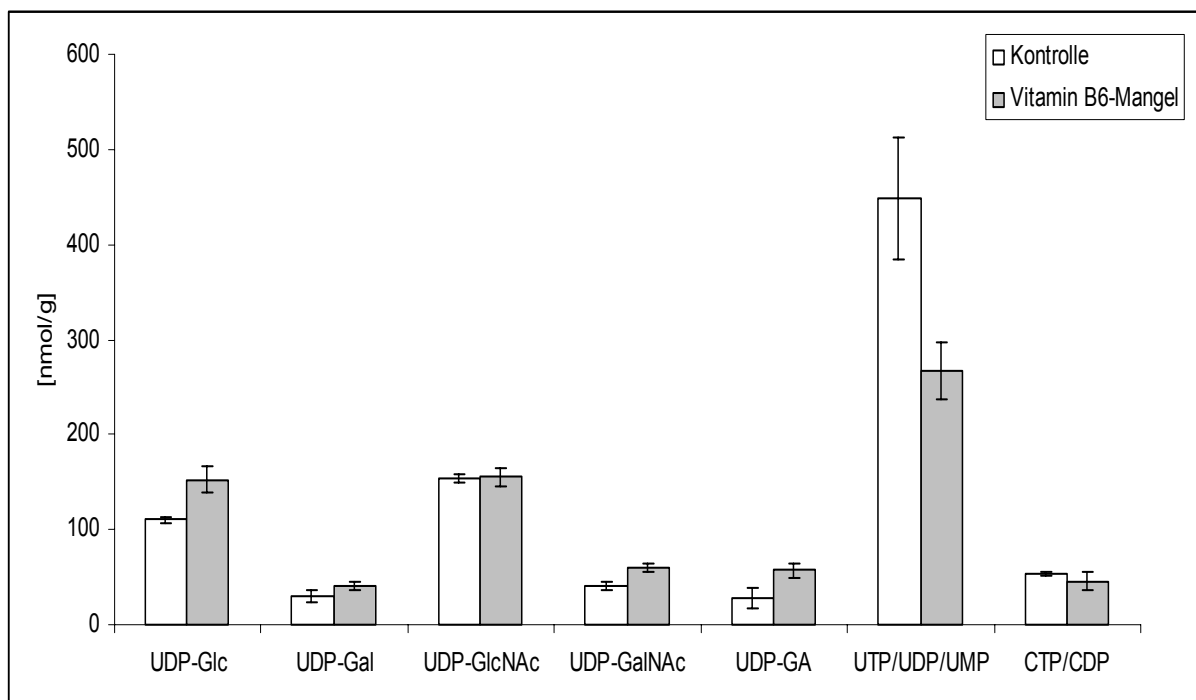


**Abb. 13: Konzentrationsbestimmung von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP und CDP in Herzgewebe Vitamin B6-mangelernährter Ratten und vollwertig ernährter Kontrolltiere.** Aufzucht und Nucleotidbestimmung siehe Legende in Abb. 12.



Niere:

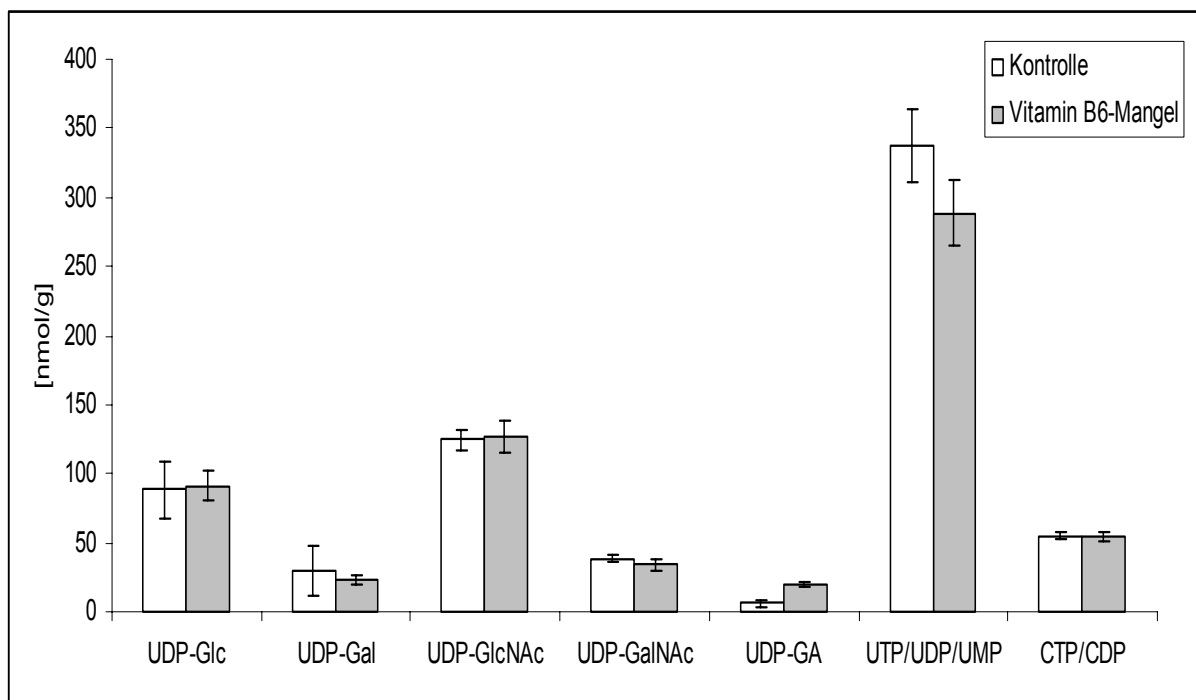
Die Veränderungen unter Vitamin B6-Mangel fielen in der Niere insgesamt heterogener aus (s. Abb. 14): Während die Konzentration von UDP-GA sich verdoppelte und die Konzentrationen von UDP-GalNAc, UDP-Glc und UDP-Gal im Vitamin B6-Mangel um das 1,3- bis 1,4-fache erhöht waren, zeigte sich für die Summe der Konzentrationen von UTP, UDP und UMP eine Konzentrationsminderung um 40% (s. Tab. 4). CTP/CDP und UDP-GlcNAc zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vitamin B6-Mangel. Die Summe der GTP- und GDP-Konzentrationen war im Vitamin B6-Mangel unverändert. Aufgrund der an die Uracilnucleotid-Konzentrationen angepassten Detektorempfindlichkeit war auch hier eine quantitative Auswertung von ATP und ADP nicht möglich.



**Abb. 14: Konzentrationsbestimmung von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP und CDP in Nierengewebe Vitamin B6-mangelernährter Ratten und vollwertig ernährter Kontrolltiere.** Aufzucht und Nucleotidbestimmung siehe Legende in Abb. 12.

Lunge:

Im Lungengewebe zeigte lediglich UDP-Glucuronsäure einen signifikanten Konzentrationsanstieg um 68% ( $p=0,02$ ) (s. Abb.15). Andere Uracilnucleotide sowie Guanin- und Cytidin-Nucleotide wiesen keine signifikanten Änderungen auf (s. Tab. 4). Aufgrund der an die Uracilnucleotid-Konzentrationen angepassten Detektorempfindlichkeit war auch hier eine quantitative Auswertung von ATP und ADP nicht möglich.

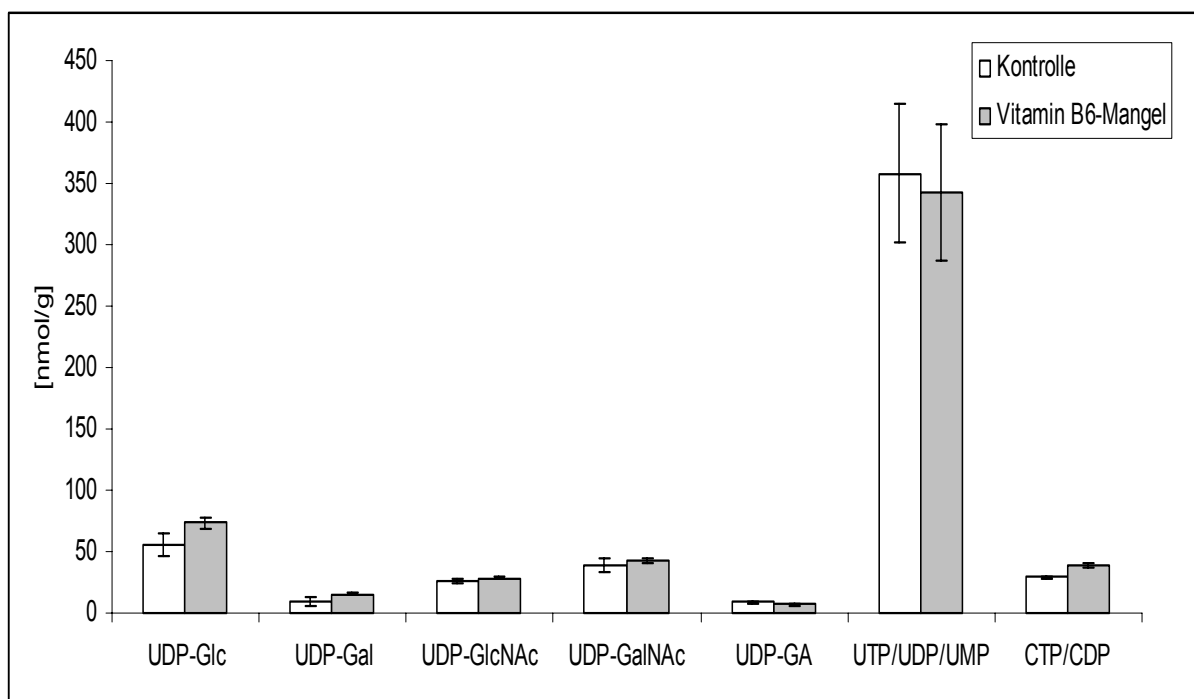


**Abb. 15: Konzentrationsbestimmung von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP und CDP in Lungengewebe Vitamin B6-mangelernährter Ratten und vollwertig ernährter Kontrolltiere.** Aufzucht und Nucleotidbestimmung siehe Legende in Abb. 12.

Gehirn:

Im Gehirngewebe waren unter Vitamin B6-Mangel die Konzentrationen von UDP-Glc und UDP-Gal um das 1,3- bzw. 1,5-fache erhöht. CTP/CDP zeigten eine Konzentrationserhöhung um das 1,4-fache, während die Summe der Konzen-

trationen von UTP, UDP und UMP sowie UDP-GlcNAc, UDP- GalNAc und UDP-GA keine signifikanten Veränderungen aufwiesen. Auffallend waren die relativ hohen Standardabweichungen bei UTP, UDP und UMP. Da das Gehirn jeweils als letztes Organ entnommen wurde, war der Ischämie-bedingte Abbau der Nucleotide weiter fortgeschritten. Die Guanin-Nucleotide zeigten keine Veränderung. ATP und ADP konnten nicht ausgewertet werden (s. o.).



**Abb. 16: Konzentrationsbestimmung von Uracilnucleotiden und -zuckern sowie CTP und CDP im Gehirn Vitamin B6-mangelernährter Ratten und vollwertig ernährter Kontrolltiere.** Aufzucht und Nucleotidbestimmung siehe Legende in Abb. 12.

In Tabelle 4 sind die Konzentrationsänderungen jeweils in Bezug auf die Kontrolltiere zusammenfassend dargestellt. Die CTP/CDP-Konzentrationen zeigten z.T. gleichgerichtete Effekte wie UTP, UDP und UMP-Konzentrationen, mit jedoch deutlich geringerer Ausprägung. GTP und GDP zeigten keinerlei Veränderungen unter Vitamin B6-Mangel (nicht aufgeführt). In Abb. 17 sind die Effekte eines Vitamin B6-Mangels auf die Summe von UTP, UDP und UMP in verschiedenen Organen der Ratte zusammengefasst.

**Tab. 4: Zusammenfassung der Konzentrationsänderungen der Uracil- und Cytidin-Nucleotide unter Vitamin B6-Mangel.** Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch (UTP, UDP, UMP, UDP-Glc, UDP-Gal) und mit Anionenaustausch-Chromatographie (UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GA, GTP, GDP, CTP und CDP). Ermittlung der Signifikanzen nach dem Mann-Whitney-Test. Eine Adjustierung konnte hier aufgrund der kleinen Versuchstierzahl allerdings nicht vorgenommen werden.

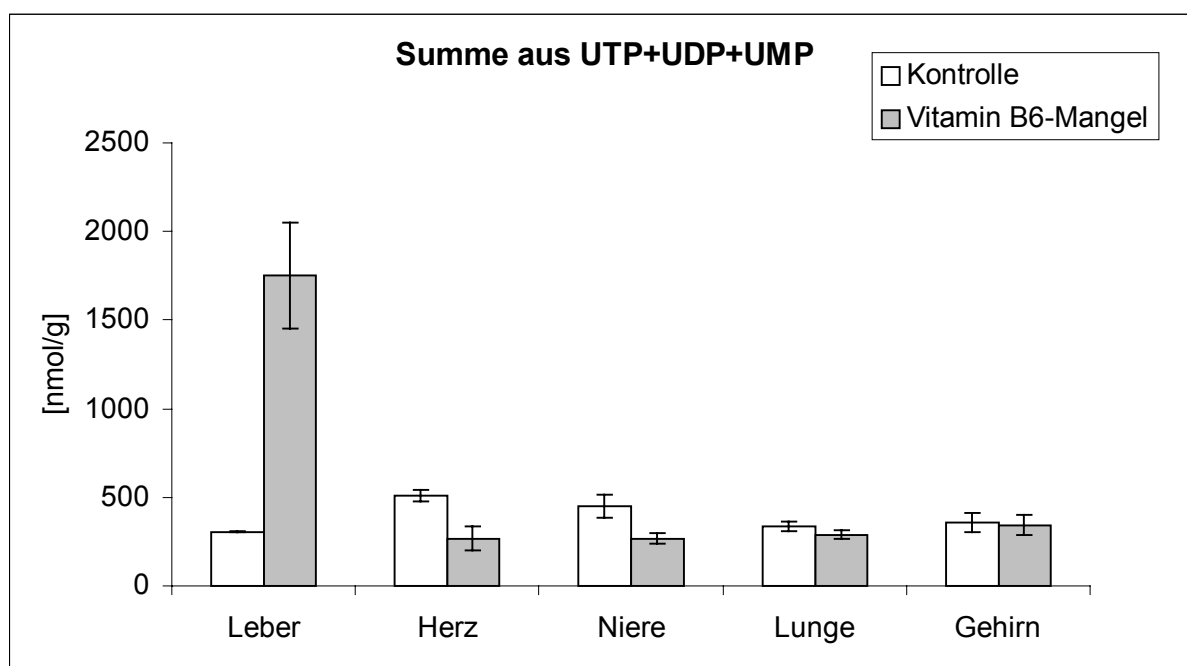
Substanzen	Konzentrationsänderung bezogen auf die Kontrolltiere				
	Leber	Herz	Niere	Lunge	Gehirn
$\Sigma$ UTP,UDP,UMP	5,8 <sup>(1)</sup>	0,6 <sup>(3)</sup>	0,6 <sup>(3)</sup>	0,8	0,9
UDP-GlcNAc	2,2 <sup>(1)</sup>	0,6 <sup>(3)</sup>	1,0	1,0	1,1
UDP-GalNAc	3,2 <sup>(1)</sup>	0,6 <sup>(3)</sup>	1,4 <sup>(3)</sup>	0,9	1,1
UDP-Glc	2,6 <sup>(1)</sup>	0,6 <sup>(2)</sup>	1,4 <sup>(3)</sup>	1,0	1,3 <sup>(3)</sup>
UDP-Gal	2,8 <sup>(1)</sup>	0,5	1,3 <sup>(2)</sup>	1,0	1,5 <sup>(3)</sup>
$\Sigma$ CTP, CDP	1,6 <sup>(1)</sup>	0,9	0,9	1,0	1,4 <sup>(3)</sup>

Signifikanz nach dem Mann-Whitney-Test

<sup>(1)</sup>  $p \leq 0,046$

<sup>(2)</sup>  $p \leq 0,039$

<sup>(3)</sup>  $p \leq 0,025$



**Abb. 17: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses des Vitamin B6-Mangels auf die Summe der Konzentrationen von UTP, UDP und UMP in verschiedenen Organen der Ratte.** Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch.

#### **6.4. Teilprojekt II: Nucleotidkonzentrationen in Rattenlebern unter dem Einfluss eines Glucocorticoidmangels bzw. Glucocorticoidüberschusses**

##### **6.4.1. Konzentrationsbestimmung von 16 Nucleotiden und Nucleotidzuckern mit Anionenaustausch-Chromatographie (SAX-HPLC) und enzymatisch-photometrische Konzentrationsbestimmung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP und UMP unter einem Glucocorticoidmangel bzw. -überschuss**

Es sollte eine Modifikation der Steroid-vermittelten Genexpression durch Vitamin B6-Mangel als mögliche Ursache für die Erhöhung der Uracilnucleotide und -zucker näher untersucht werden. Es wurden hierzu zwei Modelle gewählt: Eine Gruppe adrenaletomierter Ratten und eine Gruppe mit einem Überschuss an Glucocorticoiden, induziert durch eine zweitägige Hungerphase im Anschluss an die jeweilige Ernährung. Beide Gruppen wurden dann zusätzlich mit den Tieren aus dem Teilprojekt I (ohne Eingriff in die Glucocorticoidhomöostase) verglichen.

Die Gruppe der adrenaletomierten Vitamin B6-Mangeltiere zeigte, wie die Tiere ohne Eingriff in die Glucocorticoidhomöostase (s.u. 6.3.1.), eine deutliche Konzentrationserhöhung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP, UMP, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc im Vergleich zur adrenaletomierten Kontrollgruppe. Die Faktoren der Erhöhung lagen dabei aber um ca. 25 % niedriger als bei Tieren ohne Eingriff in die Glucocorticoid-Homöostase. CTP und CDP zeigten in adrenaletomierten Vitamin B6-Mangeltieren eine 1,8-fache Konzentrationserhöhung (s. Tab 5).

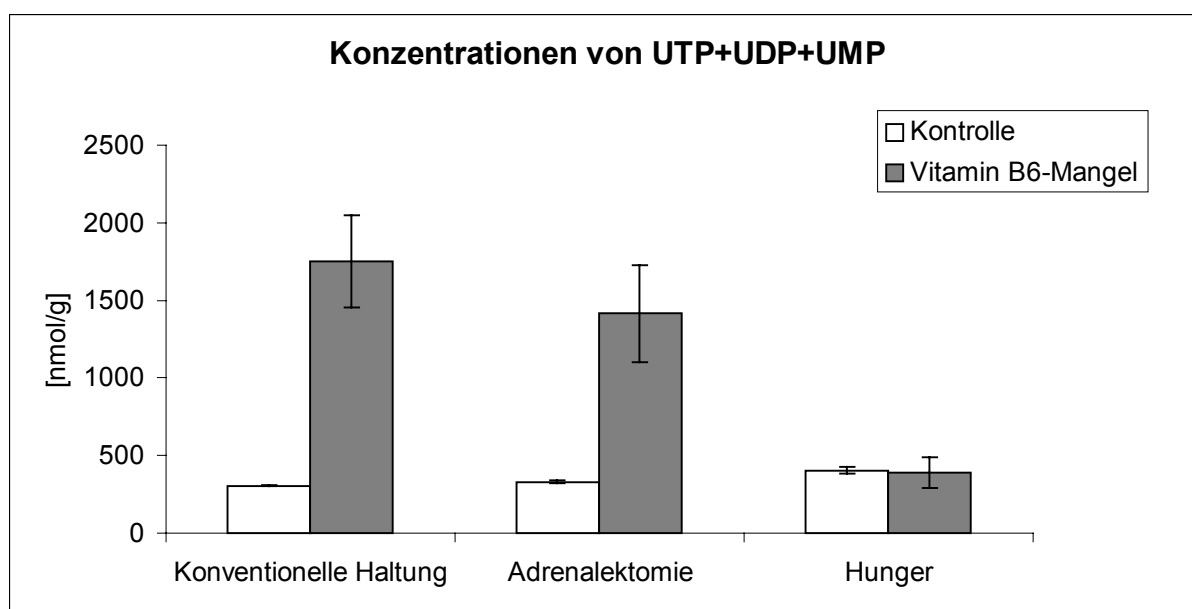
Eine statistische Auswertung konnte hier aufgrund der geringen Versuchstierzahl nicht durchgeführt werden (ein Tier der Kontrollgruppe starb nach Adrenaletomie und konnte nicht ausgewertet werden). Bei den Vitamin B6-Mangeltieren, die 2 Tage vor der Organentnahme hungerten, waren keine Veränderung der Uracilnucleotid-Konzentrationen messbar. Gleichwohl zeigten sich bei den hungernden, zuvor vollwertig ernährten Kontrolltieren gleiche Konzentrationen an Uracilnucleotiden nach zweitägiger Nahrungskarenz wie bei Kontrolltieren ohne Nahrungskarenz. Die mit normaler Haltdiät gefütterten Kontrollgruppen der einzelnen Untergruppen: Adrenaletomie, Hunger und konventionelle Haltung, wiesen keine Unterschiede der Konzentrationen von Uracil-, Guanin- oder Cytidinnucleotiden auf (s. Abb. 19). In Tabelle 5 sind die Faktoren der Uracilnucleotide und zusammengefasst.

**Tab. 5: Faktoren der Konzentrationsänderung von Uracilnucleotiden und -zuckern in der Leber von Vitamin B6-Mangelratten bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe.** Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch (UTP, UDP, UMP, UDP-Glc, UDP-Gal) und mit Anionenaustausch-Chromatographie (UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc).

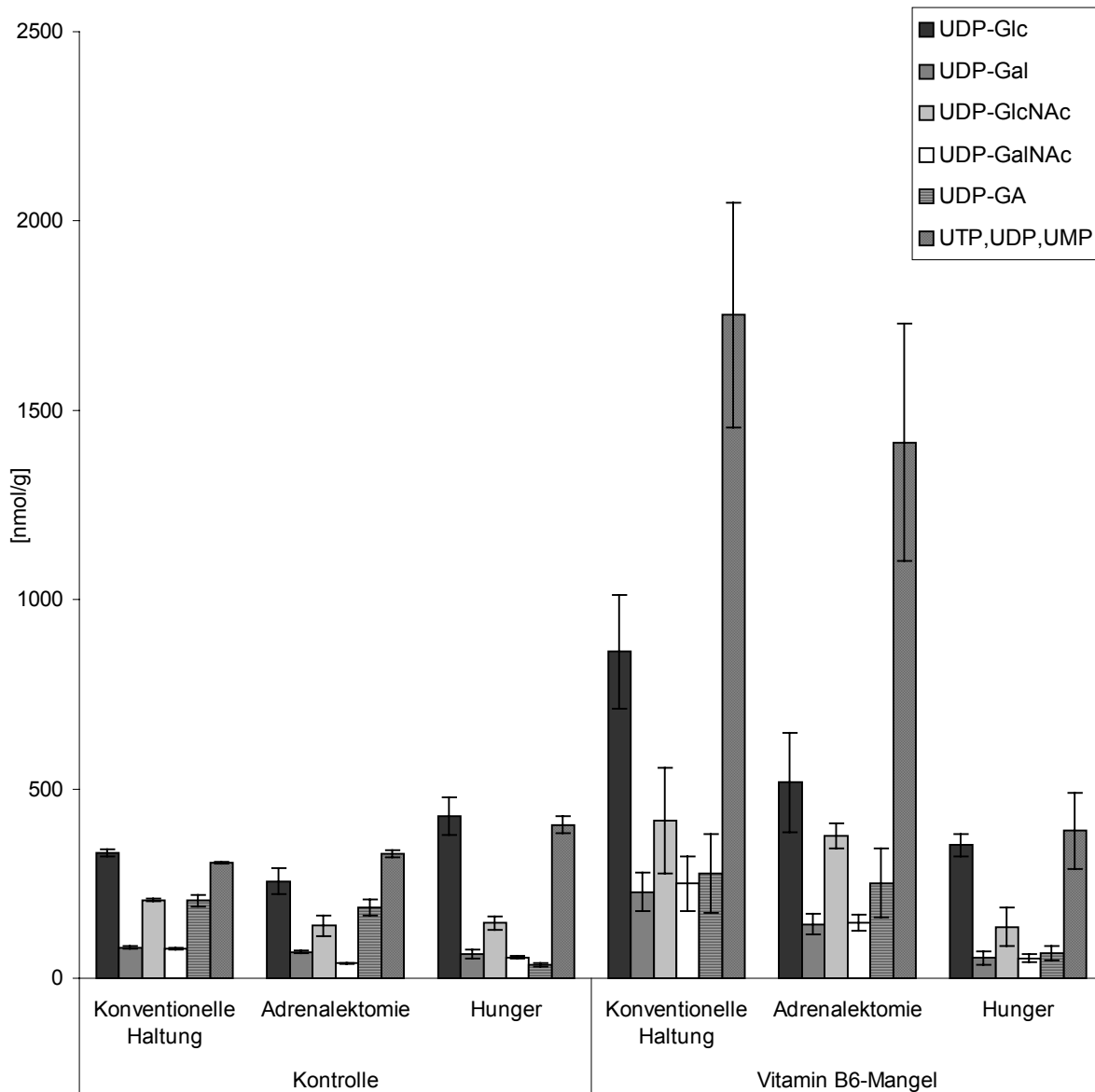
	UDP-Glc	UDP-Gal	Σ UTP+UDP+UMP	UDP-GlcNAc	UDP-GalNAc	Σ CTP+CDP
Vitamin B6-Mangel	2,6 <sup>(1)</sup>	2,8 <sup>(1)</sup>	5,8 <sup>(1)</sup>	2,2 <sup>(1)</sup>	3,2 <sup>(1)</sup>	1,6 <sup>(1)</sup>
Adrenalektomie und Vitamin B6-Mangel	2,0 <sup>(*)</sup>	2,1 <sup>(*)</sup>	4,3 <sup>(*)</sup>	2,7 <sup>(*)</sup>	3,7 <sup>(*)</sup>	1,8 <sup>(*)</sup>
Hunger (2 Tage) und Vitamin B6-Mangel	0,8	0,8	1,0	0,9	1,0	1,1

<sup>(1)</sup> Signifikanz nach dem Mann-Whitney-Test ( $p \leq 0,046$ )

<sup>(\*)</sup> Eine statistische Auswertung konnte hier aufgrund der geringen Versuchstierzahl nicht durchgeführt werden (s.o.).



**Abb. 18: Einfluss des Vitamin B6-Mangels auf die Konzentrationen von UTP, UDP und UMP in der Leber Vitamin B6-mangelernährter bzw. vollwertig ernährter a) adrenalektomierten, b) für 2 Tage hungernden und c) normal aufgezogenen Ratten.** Die Testgruppe ( $n_{\text{Vitamin B6-Mangel}} = 12$ ) erhielt über den gesamten Versuchszeitraum Vitamin B6-Mangelfutter, während die Kontrollgruppe ( $n_{\text{Kontrolle}} = 11$ ) Vollkost erhielt. In der Hunger-Gruppe erfolgte eine 2-tägige Nahrungskarenz vor der Organentnahme. Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch.



**Abb. 19: Konzentrationen von Uracilnucleotiden und Uracilnucleotidzuckern in der Leber Vitamin B6-mangelernährter bzw. vollwertig ernährter Ratten unter a) Glucocorticoidmangel (Adrenalektomie) bzw. b) Glucocorticoidüberschuss (Hunger für 2 Tage), sowie c) konventionell gehaltenen Kontrolltieren.** Die Ratten waren zu Versuchsbeginn 21 Tage alt. Die Testgruppe ( $n_{\text{Vitamin B6-Mangel}} = 12$ ) erhielt über den gesamten Versuchszeitraum Vitamin B6-Mangelfutter, während die Kontrollgruppe ( $n_{\text{Kontrolle}} = 12$ ) Vollkost erhielt. Innerhalb der beiden Gruppen erfolgte in der Untergruppe a) ( $n_{\text{Vitamin B6-Mangel}} = 4$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 4$ ) eine beidseitige Entfernung der Nebennieren am Tag 26), die Untergruppe b) ( $n_{\text{Vitamin B6-Mangel}} = 4$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 4$ ) erhielt nach 14-tägiger jeweiliger Diät 2 Tage vor der Organentnahme keinerlei Futter und die Gruppe c) ( $n_{\text{Vitamin B6-Mangel}} = 4$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 4$ ) hatte bis zum Zeitpunkt der Organentnahme freien Zugang zu jeweiliger Diät. Die Messung der Konzentrationen erfolgte enzymatisch-photometrisch (UTP, UDP, UMP, UDP-Glc, UDP-Gal) und mit Anionenaustausch-Chromatographie (UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GA, GTP, GDP, CTP und CDP).

## **6.5. Teilprojekt III: Isolierung und Analyse N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide von Zellmembranen Vitamin B6-defizienter Ratten**

### **6.5.1. Isolierung und Analyse von Rohmembranglykoproteinen aus der Rattenleber**

#### **6.5.1.1. Bestimmung des Proteingehaltes nach Delipidierung der Rohmembranen**

Es wurden 120 mg Rohmembranprotein aus Lebern von Vitamin B6-Mangeltieren und 150 mg Rohmembranprotein von Kontrolltieren gewonnen. Ein aufarbeitungs- und isolierungsbedingter Verlust von Membranprotein ist bei prinzipiell gleicher Prozedur nicht auszuschließen, eine quantitative Bezugnahme auf die jeweils eingesetzte Lebermenge ist daher unzulässig.

#### **6.5.1.3. Monosaccharidanalyse der Rohmembranglykane**

Mit der Monosaccharidanalyse war es möglich, sowohl den in einer Probe enthaltenen Oligosaccharidgehalt abzuschätzen, als auch erste Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Oligosaccharide zu ziehen. So weist das Vorkommen von GalNAc auf O-Glykane hin, ein molarer Überschuss an Mannosen gegenüber GlcNAc auf mannosereiche oder hybride Strukturen. Da die Kernregion der N-Glykane stets aus 3 Mannosen besteht, kann durch Division des ermittelten Mannosegehaltes die Menge an enthaltenen N-Glykanen hochgerechnet werden (s.u. 2.2.1.). Der geschätzte Oligosaccharidgehalt betrug im Vitamin B6-Mangel und Kontrolltieren ca. 5 nmol/mg Rohmembranprotein. Es konnte insgesamt eine ausreichende Menge an Oligosacchariden gewonnen werden. Die nachgewiesenen Monosaccharide entsprachen den Zuckern, aus denen N-Glykane aufgebaut sind. Die Anwesenheit von Galaktose belegte die Glykosylierung mit komplexen und / oder hybriden Glykanen. Der Gehalt an O-Glykanen in der Rohmembranfraktion war sehr gering. Betrachtet man die auf drei Mannosen bezogenen Konzentrationen von Galaktose und N-Acetylglucosamin, so liegt der Wert der Kontrolltiere für N-Acetylglucosamin um das 1,3-fache und für Galaktose um das 1,4-fache höher als im Vitamin B6-Mangel.

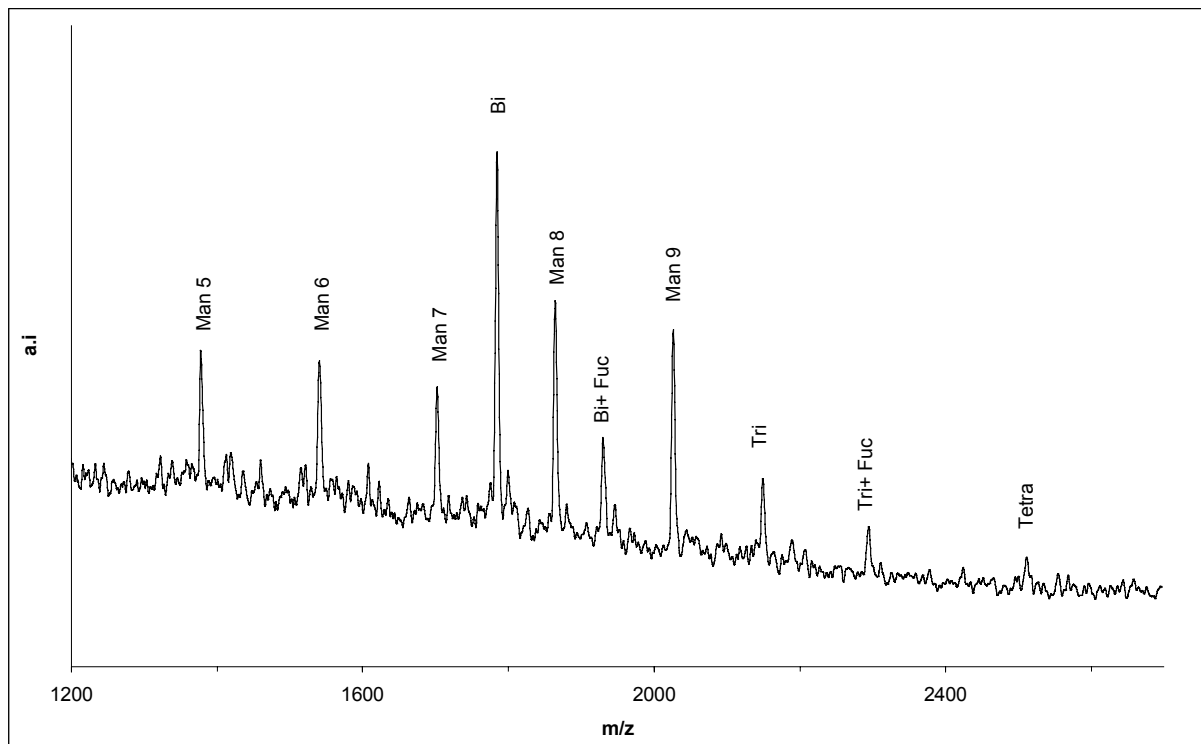


**Tab. 6: Monosaccharid-Zusammensetzung der Glykane von Rohmembranproteinen.** Die Werte sind auf 3 Mannosen normiert.

	<b>L- Fuc</b>	<b>D-GalNH<sub>2</sub></b>	<b>D-GlcNH<sub>2</sub></b>	<b>D-Gal</b>	<b>D-Man</b>
<b>Vitamin B6-Mangel</b>	0,11	(0,04)	1,37	0,54	3
<b>Kontrolle</b>	0,12	(0,08)	1,81	0,78	3

#### **6.5.1.4. Massenbestimmung der Rohmembranglykane mit MALDI-TOF-MS**

Zur Charakterisierung des neutralen Oligosaccharidgemisches der Rohmembran erfolgte eine Massenbestimmung mit MALDI-TOF-MS. Es fand sich, bei semi-quantitativer Auswertungsmöglichkeit, ein hoher Anteil an mannosereichen Oligosacchariden (Oligomannose 5 bis 9); komplexe Glykane machten einen im Vergleich geringen Anteil des Oligosaccharidgemisches aus (s. Abb. 20). Hybride Strukturen wurden in der Massenspektrometrie nicht nachgewiesen.



**Abb. 20: Massenbestimmung des desialylierten Glykangemisches aus Rattenleber-Rohmembranen mit MALDI-TOF-MS.** Dargestellt ist das Massenspektrum der Rohmembran-Glykane von Vitamin B6-defizienten Ratten. Das Oligosaccharid-Spektrum der Kontrolltiere ist nicht abgebildet, es zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu den Mangelansätzen. Die Glykane wurden nach Abspaltung von den Membranproteinen mit PNGase F durch den Verdau mit Neuraminidase desialyliert und konnten als ungeladene Zucker mit MALDI-TOF-MS vermessen werden. Anhand eines Standarddextranhydrolysates wurde die gemessene Flugzeit der Partikel der entsprechenden Masse zugeordnet. Kristallisationsmatrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

## 6.5.2. Isolierung und Analyse von Plasmamembran-Glykoproteinen aus der Rattenleber

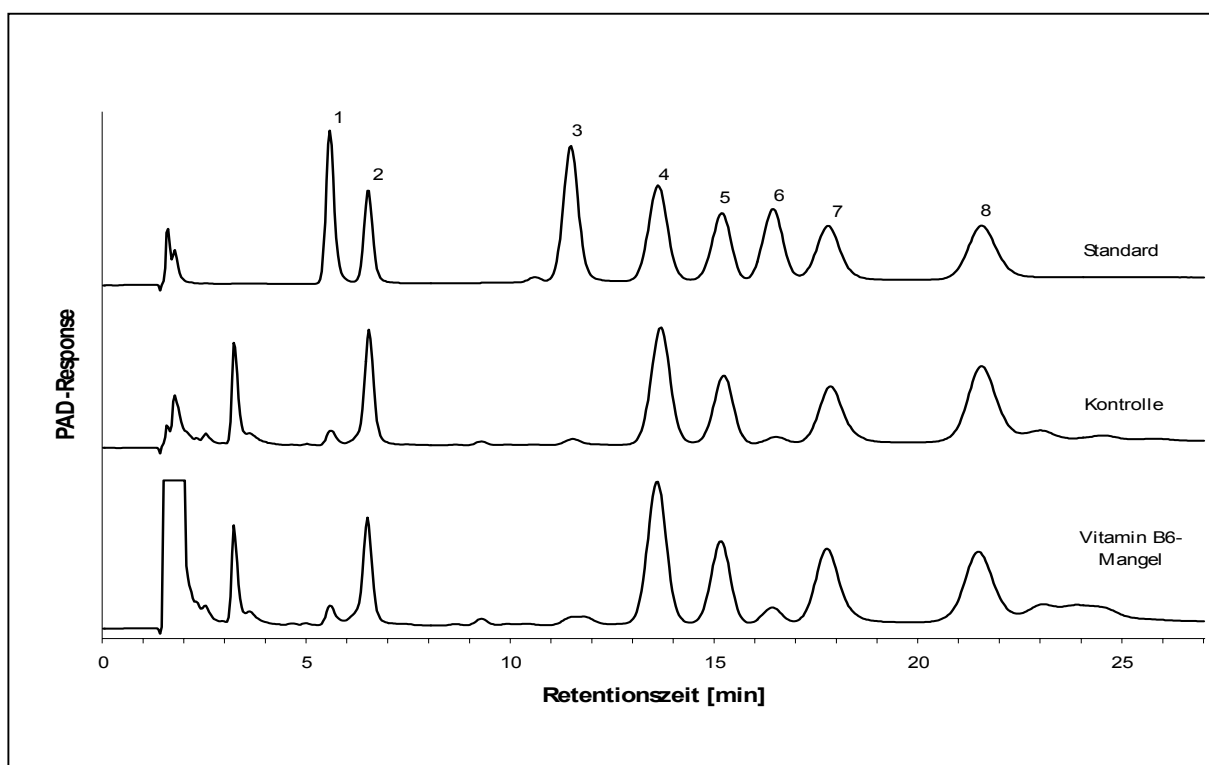
### 6.5.2.1. Bestimmung des Proteingehaltes nach Delipidierung der Plasmamembranen

Die Isolierung von Plasmamembranen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation (s.u. 4.1.4.). Das Gesamtgewicht der eingesetzten Lebern betrug 35 g im Vitamin B6-Mangel, 34 g in Kontrolltieren. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Assay (s.u. 4.1.8.3.).

Es wurden 13 mg Plasmamembranprotein aus Lebern von Vitamin B6-Mangeltieren und 21 mg Plasmamembranprotein von Kontrolltieren gewonnen. Ein aufarbeitungs- und isolierungsbedingter Verlust von Membranprotein ist bei prinzipiell gleicher Prozedur nicht auszuschließen, eine quantitative Bezugnahme auf die jeweils eingesetzten Lebermengen ist daher unzulässig.

#### **6.5.2.2. Monosaccharidanalyse der Plasmamembranglykane**

Die Monosaccharidanalyse erfolgte mit HPAEC-PAD nach vorangegangener saurer Hydrolyse der Glykane, wie unter 4.1.7.3., 4.1.8.1. und 6.5.1.3. beschrieben. Die Oligosaccharide wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie getrennt und anhand eines externen Standards quantifiziert. Eine Verlustbestimmung unter der Aufarbeitung erfolgt mittels der beiden internen Standards Fructose und Desoxyribose. In Abbildung 21 sind Chromatogramme der Monosaccharidanalyse der Plasmamembranglykane mit *High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography with pulsed amperometric Detection* (HPAEC-PAD) dargestellt. (1) Chromatogramm des externen Standardgemisches, (2) Chromatogramm der Plasmamembranglykane der Lebern von Vitamin B6-Mangelratten, (3) Chromatogramm der Plasmamembranglykane der Lebern von vollwertig ernährten Kontrolltieren. Peak 2 (Desoxyribose) und Peak 8 (Fructose) sind die zugefügten internen Standards.



**Abb. 21: Monosaccharidanalyse der Plasmamembranglykane mit *High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography with pulsed amperometric Detection* (HPAEC-PAD).** (1) Chromatogramm des Standardgemisches mit 1 = Fucose, 2 = Desoxyribose, 3 = Galaktosamin, 4 = Glucosamin, 5 = Galaktose, 6 = Glucose, 7 = Mannose, 8 = Fructose. (2) Chromatogramm der Plasmamembranglykane der Lebern von Vitamin B6-Mangelratten. (3) Chromatogramm der Plasmamembranglykane der Lebern von vollwertig ernährten Kontrollratten. Die Plasmamembranhomogenate wurden mit 4 N TFA hydrolysiert und nach Entfernung der TFA mit je 2 nmol Fructose und Desoxribose als interne Standardsubstanzen versetzt. Die Elution der Zucker von der Säule (Dionex Carbo Pac PA-1) erfolgte nach dem unter 4.1.7.3. dargestellten Gradientenprogramm. Der Nachweis der Substanzen erfolgte mit gepulster amperometrischer Detektion.

In der Monosaccharidanalyse von Plasmamembranglykanen zeigten sich zunächst ebenfalls N-Glykan-aufbauende Monosaccharide, der Gehalt an N-Acetyl-galaktosamin und damit O-Glykanen war erwartungsgemäß sehr gering. Der deutlich höhere Gehalt an Galaktose sowie das Verhältnis Mannose/ N-Acetylglucosamin von 3:3,2 in Vitamin B6-Mangelratten bzw. 3:3,6 in Kontrolltieren im Vergleich zu Rohmembranaufarbeitungen (3:1,4 bei Mangeltieren und 3:1,8 bei Kontrolltieren) wies auf einen deutlich höheren Gehalt an komplexen und/oder hybriden Glykanen hin. Insgesamt konnte durch die Plasmamembranaufarbeitung der Anteil an mannose-

reichen Strukturen und damit die vermutete Verunreinigung mit Membranen des ER und Golgi-Apparates stark reduziert werden (s. Tab. 7).

**Tab. 7: Monosaccharid-Zusammensetzung der Glykane von Plasmamembranproteinen.** Die Werte sind auf 3 Mannosen normiert.

	<b>L- Fuc</b>	<b>D- GalNH<sub>2</sub></b>	<b>D- GlcNH<sub>2</sub></b>	<b>D-Gal</b>	<b>D-Man</b>
<b>Vitamin B6-Mangel</b>	0,68	(0,08)	3,22	2,62	3
<b>Kontrolle</b>	0,71	(0,11)	3,64	2,86	3

Aus dem Monosaccharidgehalt der Plasmamembranen wurde desweiteren der Gehalt an Oligosacchariden pro Milligramm Plasmamembranprotein berechnet. Er betrug für Vitamin B6-Mangel und Kontrolltiere 11-14 nmol pro Milligramm Plasmamembranprotein. Im Vergleich mit dem Oligosaccharidgehalt von Rohmembranprotein zeigte sich ein deutlich höherer Gesamtglykangehalt, bezogen auf ein Milligramm Membranprotein in der Plasmamembran.

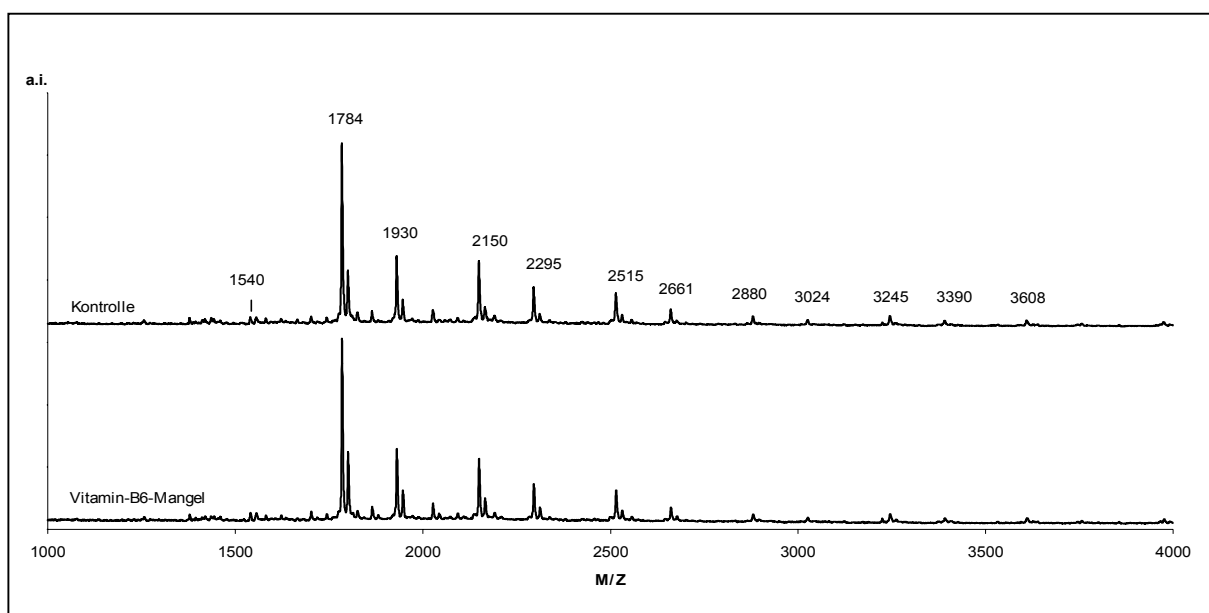
### **6.5.2.3. Charakterisierung der neutralen Oligosaccharide der Plasmamembranproteine**

#### **6.5.2.3.1. Enzymatische Deglykosylierung der Plasmamembran- und Rohmembranglykoproteine**

Die Abspaltung der N-Glykane vom Proteinanteil der Glykoproteine erfolgte enzymatisch durch PNGase F nach vorangegangenem tryptischen Verdau (s.u. 4.1.6.1., 4.1.6.2.). Zur Bestimmung möglicher Verluste durch unvollständige Abspaltung der Glykane vom Peptidrest wurde die Monosaccharidanalyse von je 5% der mit PNGase F behandelten Glykopeptide vor- und nach Kationenaustauscher durchgeführt. Weniger als 5% der Oligosaccharide waren jeweils auf dem Kationenaustauscher verblieben. Es konnte von einer vollständigen Deglykosylierung ausgegangen werden.

### 6.5.2.3.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie der neutralen Oligosaccharide

Nach Deglykosylierung und Desialylierung wurde das neutrale Oligosaccharidgemisch in seiner Gesamtheit massenspektrometrisch analysiert, um vorab bereits qualitative Aussagen zur Glykanzusammensetzung zu erhalten. Die gefundenen Massen konnten den verschiedenen Glykanstrukturen zugeordnet werden.



**Abb. 22: Massenbestimmung des desialylierten Oligosaccharidgemisches mit MALDI-TOF-MS.** Massenspektren der Plasmamembranglykane von Kontrolltieren (oben) und von Vitamin B6-Mangeltieren (unten). Die Glykane wurden nach Abspaltung von den Plasmamembranproteinen mit PNGase F durch den Verdau mit Neuraminidase desialyliert und konnten als ungeladene Zucker mit MALDI-TOF-MS vermessen werden. Anhand eines Standard-Dextranhydrolysates wurde die gemessene Flugzeit der Partikel der entsprechenden Masse zugeordnet. Kristallisationsmatrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

Das an die Glykane gebundene Fluoreszenzlabel 2-Aminobenzamid erhöhte die Massen der verschiedenen Oligosaccharidstrukturen um 120 Da im Vergleich zu unmarkierten Glykanen. Es fanden sich keine Signale von unmarkierten Oligosacchariden, somit konnte in den folgenden chromatographischen Charakterisierungen der Glykane eine vollständige Fluoreszenzmarkierung vorausgesetzt werden. Ein breites Spektrum von biantennären (1784 Da), triantennären (2150 Da) und tetraantennären Glykanen (2515 Da), jeweils mit und ohne Fucose (146 Da),

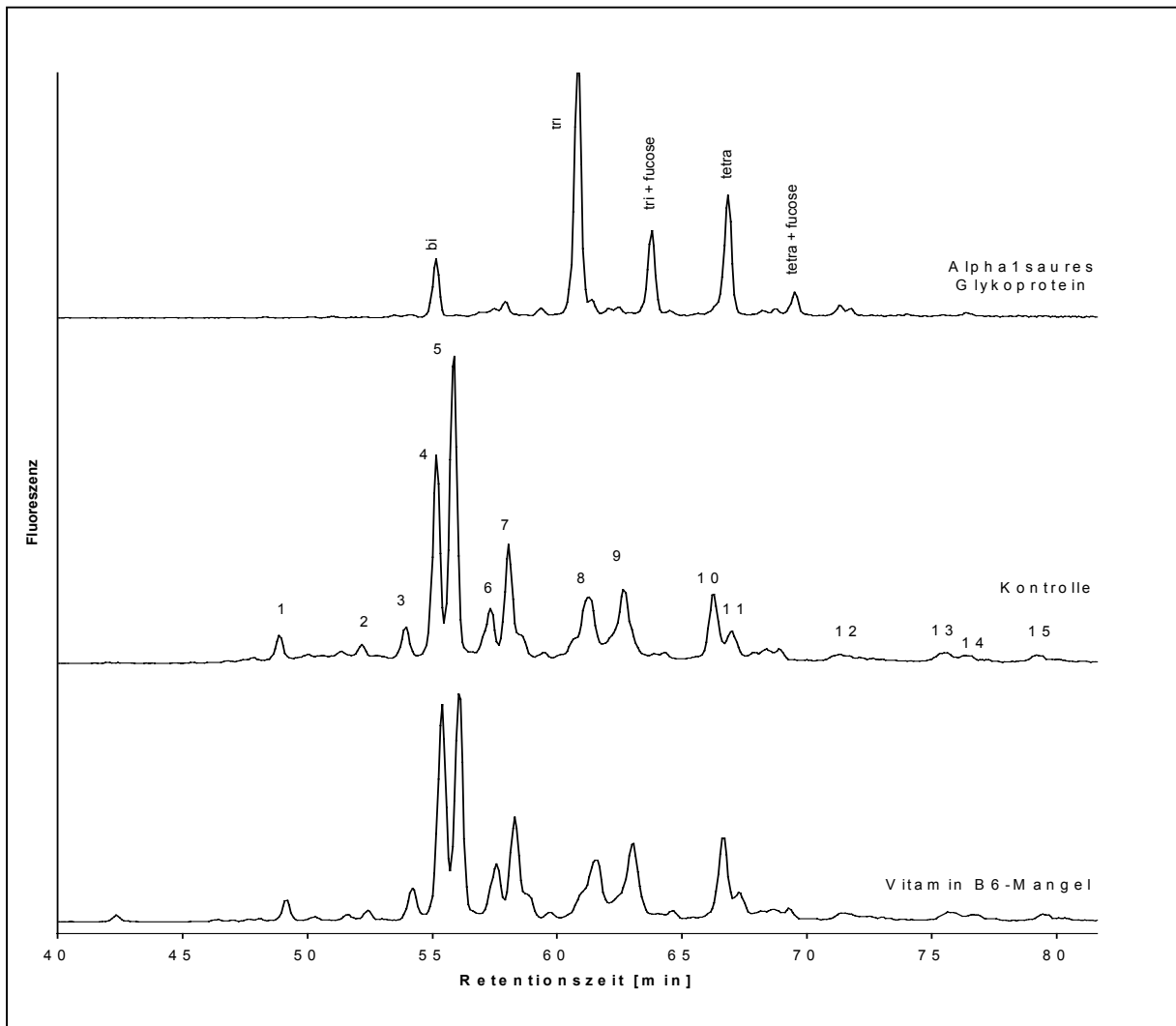
sowie mannosereichen Strukturen (z. B. Oligomannose 6 mit 1540 Da) konnte nachgewiesen werden. In geringerem Maße wurden tetraantennäre Glykane mit *repeating-unit* (2880 Da) und Fucosylierung (3024 Da), tetraantennäre Glykane mit 2 *repeating-units* (3245 Da) und Fucose (3390 Da) sowie tetraantennäre Glykane mit 3 *repeating-units* (3608 Da) gefunden (s. Abb. 22).

Die Massenspektren der Plasmamembran-Gesamtglykane von Vitamin B6-Mangeltieren und Kontrolltieren waren vollständig identisch.

#### 6.5.2.3.3. Trennung der N-Glykane mit Aminophase-HPLC

Es zeigte sich in der Aminophase-HPLC eine Auftrennung des Oligosaccharidgemisches in insgesamt 15 Fraktionen mit 11 Hauptfraktionen > 1% des Gesamtgemisches. Die Quantifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgte durch Integration der Peaks und Berechnung der "Area-under-the-curve". Anhand des mitlaufenden externen Standards  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein konnte über die Retentionszeit bereits eine erste Strukturzuordnung der Fraktionen 4 und 5 (biantennäre Oligosaccharide), 9 (triantennäres monofucosyliertes Oligosaccharid) und 10 (tetraantennäres Oligosaccharid) erfolgen (s. Abb. 23). In der Auftrennung durch Aminophase-HPLC bestätigte sich die hohe Übereinstimmung der Plasmamembran-Glykanmuster von Vitamin B6-Mangeltieren gegenüber Kontrolltieren.

In der Abbildung 23 wird deutlich, dass einige Fraktionen in der Aminophase-HPLC nicht vollständig getrennt wurden; es musste hier von einer Heterogenität der unter dem Peak liegenden Glykane ausgegangen werden. In der nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchung der Fraktionen mit MALDI-TOF-MS konnten entsprechend z.T. mehrere Glykanstrukturen in einer Aminophase-Fraktion nachgewiesen werden.



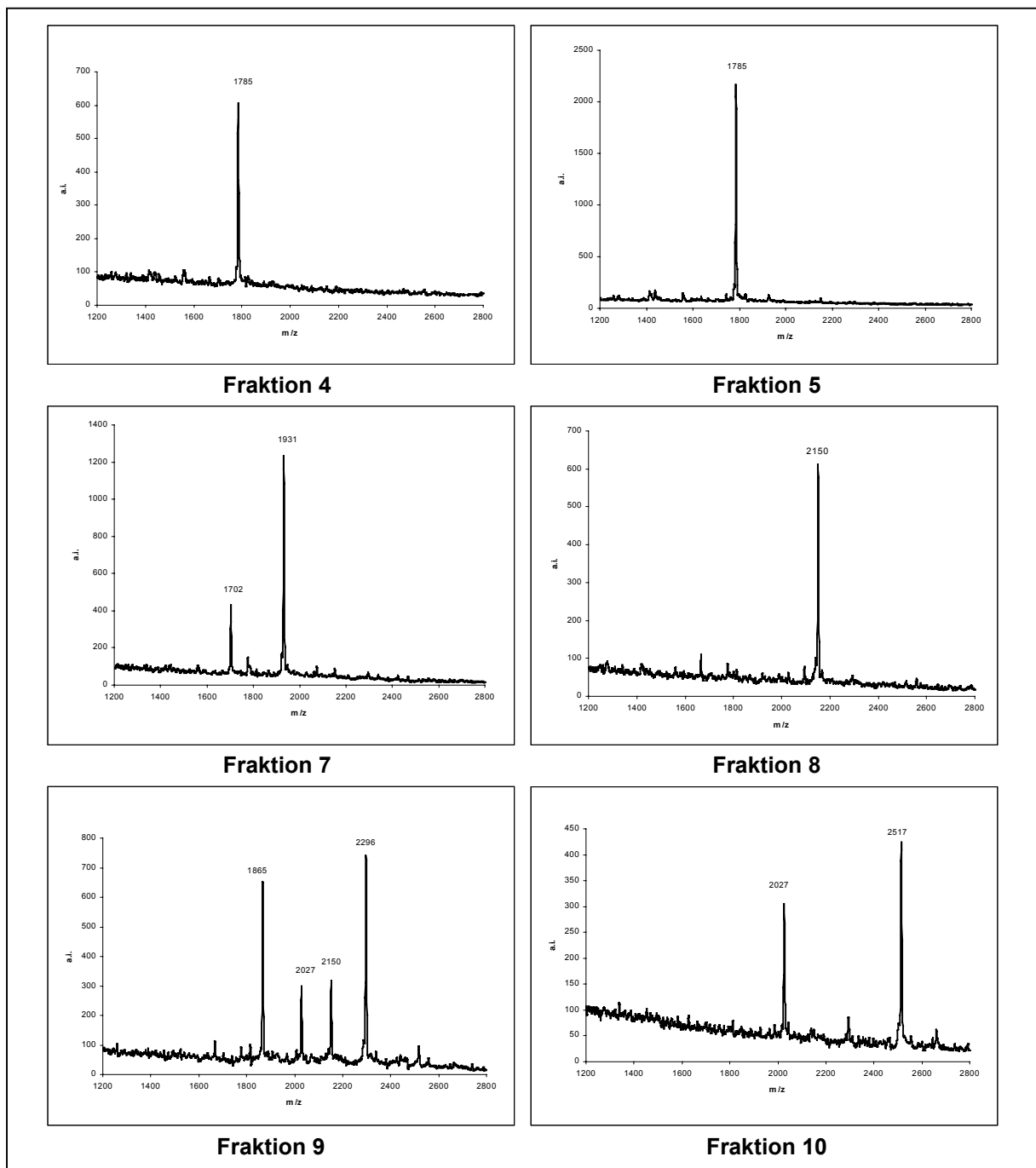
**Abb. 23: Chromatographische Trennung der desialylierten N-Glykane mit Aminophase-HLPC.** (1) Elutionsprofil der Glykane von  $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein als Referenzsubstanz (bi = biantennäres Glykan, tri = triantennär, tri + fuc = triantennär monofucosyliert, tetra = tetraantennär, tetra + fuc = tetraantennär monofucosyliert). (2) Chromatogramm der Plasmamembranglykane von Kontrolltieren: 1=Mannose 5, 2 = biantennär monofucosyliert, 3 = Mannose 6, 4 + 5 = biantennär, 6 + 7 = biantennär monofucosyliert, 8 = triantennär, 9 = triantennär monofucosyliert, 10 = tetraantennär, 11 = tetraantennär monofucosyliert, 12 = tetrantennär mit *repeat*, 13 = tetraantennär mit 2 *repeats*, 14 = tetraantennär monofucosyliert mit 2 *repeats*, 15 = tetraantennär mit 3 *repeats* (3) Chromatogramm der Plasmamembranglykane von Vitamin B6-Mangelratten. Die Trennung erfolgte nach dem unter 4.1.7.1. dargestellten Gradientenprogramm über eine APS-2 Hypersil-Säule.



#### **6.5.2.3.4. MALDI-TOF-Massenspektrometrie der Aminophase-Fractionen der Plasmamembranglykane**

Die zuvor über die Retentionszeiten charakterisierten Fraktionen 1 bis 15 der neutralen N-Glykane wurden zusätzlich mittels massenspektrometrischer Analysen den verschiedenen Glykanstrukturen zugeordnet.

Während die Fraktionen 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12 und 13 jeweils einer Glykanstruktur zugeordnet werden konnten, wurden unter den anderen Peaks zwei, z. T. auch mehrere Glykane mit unscharfer Trennung in der Aminophase-HPLC nachgewiesen. Die Fraktionen 4 und 5 sowie 6 und 7 zeigten eine gute Trennung in der Aminophase-HPLC mit unterschiedlichen Retentionszeiten, in der Massenanalyse fanden sich aber gleiche Massen. Es handelte sich hierbei um Bindungsisomere einer Struktur, die aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften ein anderes Elutionsverhalten aufwiesen (s. Abb. 24). In der massenspektrometrischen Analyse der Aminophasefraktionen fanden sich keine Abweichungen zwischen Vitamin B6-Mangel und Kontrolle. In Tabelle 8 ist die quantitative Auswertung der Aminophasefraktionen mit Zuordnung der massenspektrometrisch nachgewiesenen Glykanstrukturen für Vitamin B6-Mangel und Kontrolltiere dargestellt.



**Abb. 24: Darstellung der MALDI-TOF-Massenspektren ausgewählter Aminophase-HPLC-Fraktionen von Vitamin B6-Mangelratten.** Hier stellvertretend die Darstellung der Massenspektren von Fraktionen der Vitamin B6-Mangelratten. Die Untersuchung der Aminophase-Fraktionen der Kontrolltiere zeigte die gleichen Spektren. Fraktion 4 und 5: biantennäre Glykane (1785 Da); Fraktion 7: Mannose 7 (1702 Da) und biantennäre fucosylierte Glykane (1931 Da); Fraktion 8: triantennäre Glykane (2150 Da); Fraktion 9: Mannose 8 (1865 Da), Mannose 9 (2027 Da), triantennäre Glykane (2150 Da) und triantennäre fucosylierte Glykane (2296 Da); Fraktion 10: Mannose 9 (2027 Da) und tetraantennäre Glykane (2517 Da). Alle Massenangaben inklusive 2-AB-Label.

**Tab. 8: Charakterisierung der desialylierten N-Glykanfraktionen aus der Aminophase-HPLC der Plasmamembranen von Vitamin B6-Mangelratten und Kontrolltieren anhand der Retentionszeiten und der Massen.** Strukturen: Bi = biantennär; tri = triantennär; tetra = tetraantennär; bi + fuc = biantennär, monofucosyliert; tri + fuc = triantennär, monofucosyliert; man 5, (6), (7), (8), (9) = Oligomannose 5, (6), (7), (8), (9).

Vitamin B6-Mangel			Kontrolltiere			Vitamin B6-Mangel/ Kontrolltiere	
Peak NH <sub>2</sub> - HPLC	Retentions- zeit [min]	Anteil [%]	Peak NH <sub>2</sub> - HPLC	Retentions- zeit [min]	Anteil [%]	Masse [Da]	Struktur- zuordnung
1	48,97	1,4	1	48,72	1,8	1378 1785	man 5 bi
2	52,29	0,7	2	51,97	1,3	1785 1930	bi bi+fuc
3	54,09	2,8	3	53,78	2,7	1540	man 6
4	55,24	17,5	4	55,02	15,0	1785	bi
5	55,94	18,3	5	55,70	21,8	1785	bi
6	57,43	5,6	6	57,20	5,2	1930	bi+fuc
7	58,16	11,0	7	57,92	10,7	1703 1930	man 7 bi+fuc
8	61,45	10,3	8	61,16	10,2	2150	tri
9	62,91	10,9	9	62,56	9,9	1865 2027 2151 2296	man 8 man 9 tri tri+fuc
10	66,52	7,94	10	66,15	6,5	2026 2514	man 9 tetra
11	67,15	2,57	11	66,87	2,7	2660	tetra+ fuc
12	71,40	1,50	12	71,20	1,24	2880	tetra+ <i>repeat</i>
13	75,69	1,23	13	75,43	1,15	3246	tetra+ 2 <i>repeat</i>
14	76,53	0,81	14	76,35	0,88	3246 3392	tetra+ 2 <i>repeat</i> tetra+ 2 <i>repeat</i> + fuc
15	79,36	1,06	15	79,12	1,11	3611 3757	tetra+ 3 <i>repeat</i> tetra+ 3 <i>repeat</i> + fuc

Auch in der quantitativen Auswertung der Glykanverteilung (s. Tab. 9) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Glykosylierungsmuster der Plasmamembranen von Vitamin B6-Mangel- zu Kontrollratten.

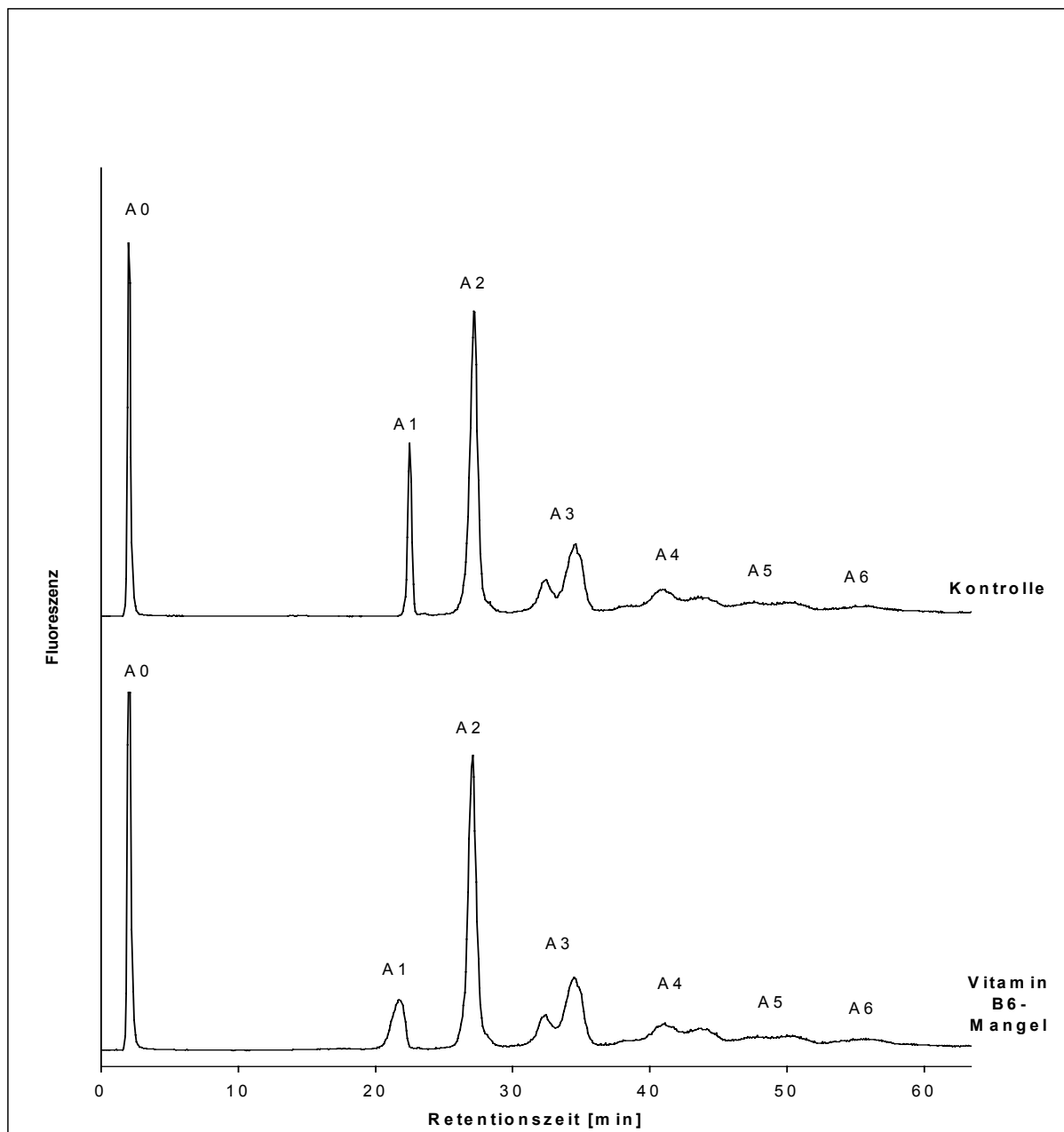
**Tab. 9: Anteile an komplexen Oligosacchariden am Gesamtglykangemisch**

Struktur	Vitamin B6-Mangel [%]	Kontrolle [%]
biantennär +/- fucose	54,5	55,8
triantennär +/- fucose	21,2	20,1
tetraantennär +/- fucose	10,4	9,2
tertraantennär + <i>repeats</i> +/- fucose	3,5	3,4
Σ (=Anteil an komplexen OS)	89,6	88,5

#### 6.5.2.4. Charakterisierung der geladenen Oligosaccharide der Plasmamembran

##### 6.5.2.4.1. Trennung der geladenen Oligosaccharide über Anionenaustausch-HPLC (Mono Q)

Ein Teil der N-Glykane trägt endständig N-Acetylneuraminsäurereste und zählt neben den Sulfat-tragenden N-Glykanen zu den sauren Oligosacchariden. Diese geladenen N-Glykane wurden mit Anionenaustausch-HPLC mit Mono Q-Säulenmaterial nach Anzahl ihrer negativen Ladungen getrennt. Die Trennung wurde hierbei von anderen Strukturmerkmalen kaum beeinflusst, so dass Fraktionen von neutralen (A0), einfach negativ geladenen (A1), zweifach negativ geladenen (A2) bis hin zu sechsfach negativ geladenen Oligosacchariden (A6) isoliert werden konnten (s. Abb. 25). Die neutralen Oligosaccharide eluierten bereits im Durchlauf und fielen mit dem Injektionspeak zusammen. Eine quantitative Auswertung des Anteils an neutralen Oligosacchariden konnte somit erst nach Desialylierung und Rechromatographie über Aminophase-HPLC stattfinden. Es erfolgte zunächst eine Trennung der geladenen N-Glykane über Anionenaustausch-Chromatographie. Die Fraktionen wurden gesammelt und nach Desialylierung über die Aminophase-HPLC erneut chromatographiert und mit MALDI-TOF-MS vermessen (s.u. 4.1.1.). So konnten den verschiedenen Sialylierungsgruppen die Oligosaccharidstrukturen zugeordnet und deren Anteile am Gesamtglykangemisch quantifiziert werden.



**Abb. 25: Trennung der N-Glykane nach Anzahl der negativen Ladungen mittels Anionenaustausch-HPLC.** (1) Chromatogramm der sialylierten N-Glykane der Plasmamembranen von Kontrollratten, (2) Chromatogramm der sialylierten N-Glykane der Plasmamembranen von Vitamin B6-Mangelratten. Die geladenen Oligosaccharide wurden in Fraktionen mono- (A1), di- (A2), tri- (A3), tetra- (A4), penta- (A5) sowie hexasialylierter Glykane (A6) getrennt. Die Trennung erfolgte nach dem unter 4.1.7.2. dargestellten Gradientenprogramm über eine Mono Q-Säule mit den Eluenten A: 0,6 M Ammoniumacetat (pH 7,0), Eluent B: aq. bidest. Detektion bei  $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=420 \text{ nm}$  mittels Fluoreszenz-Spektrometer.

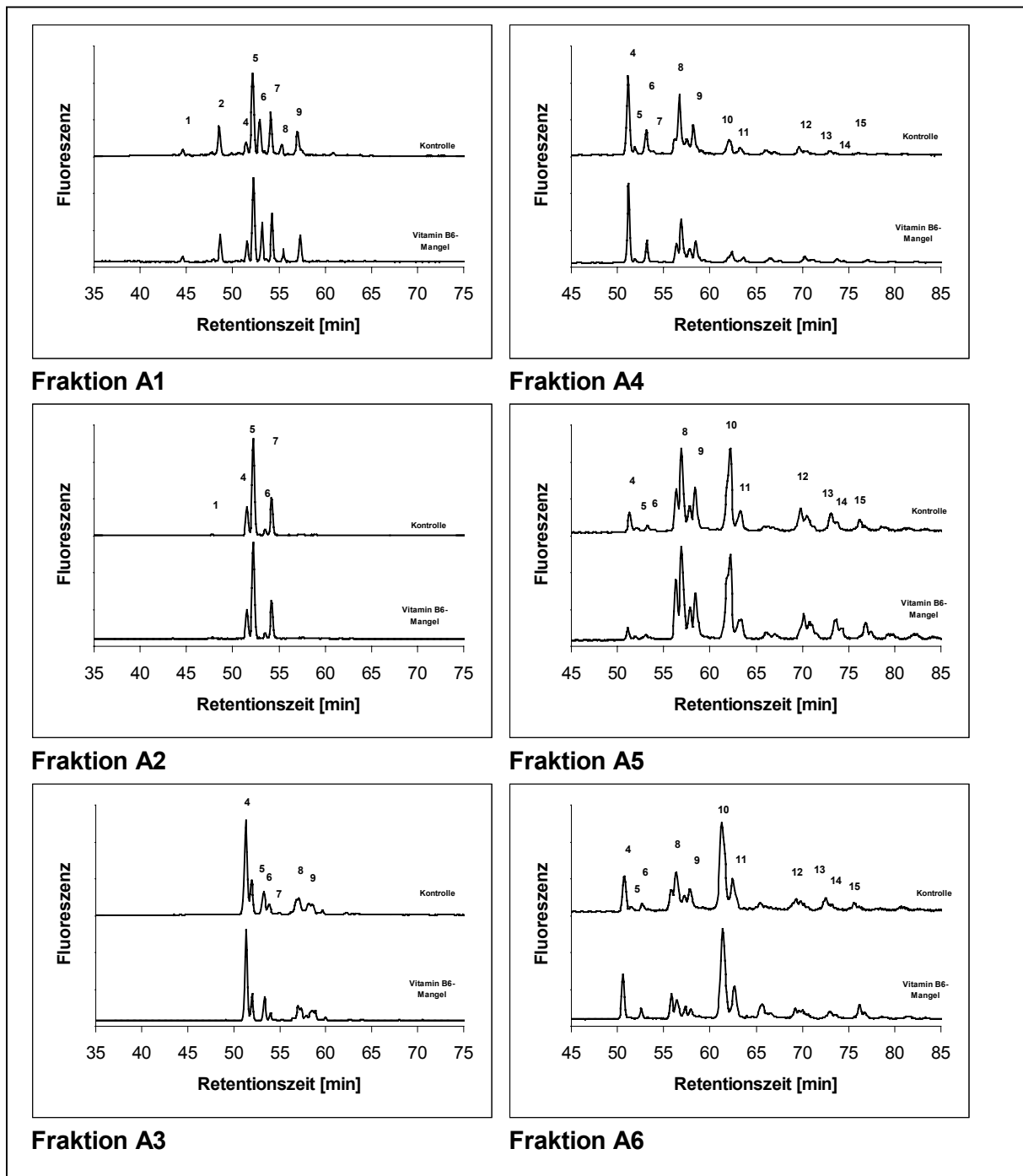
Der Sialylierungsgrad des N-Glykangemisches war bei Vitamin B6-Mangeltieren und Kontrolltieren gleich, er lag bei Vitamin B6-Mangeltieren bei 96% und bei den Kontrolltieren bei 94%. Auch hinsichtlich der Verteilung fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Sialylierungsgrad der Oligosaccharide (s. Tab 10).

**Tab. 10: Gehalt an sialylierten und nichtsialylierten Oligosacchariden von Plasmamembranproteinen der Rattenleber**

	<b>A0</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>
<b>Vitamin B6-Mangel</b>	4%	9%	30%	23%	18%	10%	6%
<b>Kontrolle</b>	6%	9%	33%	22%	17%	9%	4%

#### **6.5.2.4.2. Rechromatographie der einzelnen Mono Q-Fractionen mit Aminophase-HPLC nach Desialylierung**

Die Fraktionen der einfach bis sechsfach geladenen sialylierten N-Glykane wurden durch enzymatische Desialylierung mit Neuraminidase in neutrale Oligosaccharide überführt und konnten nun über Aminophase-HPLC weiter nach Antennarität und Fucosylierung aufgetrennt werden (s.u. 4.1.6.3.). Es erfolgte eine erste Strukturzuordnung durch die Retentionszeiten in der Aminophase-HPLC (s. Abb. 26).



**Abb. 26: Chromatographische Trennung der desialylierten Mono Q-Fractionen der Plasmamembranglykane aus der Rattenleber mittels Aminophase-HPLC.** Chromatogramme der Kontrolltiere (jeweils oben) und der Vitamin B6-Mangeltiere (jeweils unten). Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie wurden enzymatisch desialyliert und über Aminophase-HPLC nach Antennarität und Fucosylierung aufgetrennt. Die Trennung erfolgte nach dem unter 4.1.7.1. dargestellten Gradientenprogramm über eine APS-2 Hypersil-Säule mit den Eluenten A: 15 mM Natriumdihydrogenphosphat (pH 5,2), Eluent B: Acetonitril p.a., Detektion bei  $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$  mittels Fluoreszenz-Spektrometer.

### 6.5.2.4.3. Massenbestimmung der desialylierten Mono Q-Fractionen mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Identifizierung der desialylierten N-Glykane der Mono Q-Fractionen A0 bis A6 erfolgte zunächst über das Elutionsprofil und wurde zusätzlich durch massenspektrometrische Daten verifiziert. Nach Desialylierung der Fractionen A1 bis A6 erfolgte eine Vermessung aller Mono Q-Fractionen mit MALDI-TOF-MS (s. Tab. 11). Mit einer Gesamtsialylierung von 96% im Vitamin B6-Mangel und 94% bei Kontrolltieren waren die Plasmamembranglykane der Rattenleber in hohem Grad sialyliert. Die Hauptkomponente der A0-Fraktion waren mannosereiche Strukturen, zu einem geringen Teil auch biantennäre Oligosaccharide. Die Hauptfraktion am Gesamtglykangemisch bestand aus biantennären, bisialylierten Oligosacchariden, die zweitgrößte Fraktion wurde von biantennären dreifach sialylierten Glykanen gebildet. Ein Teil der Oligosaccharide enthielt eine hohe Anzahl an Sialinsäuren. Es fanden sich biantennäre Oligosaccharide mit drei und mit vier Sialinsäuren, sowie triantennäre Glykane mit vier und mit fünf Sialinsäuren. Diese Übersialylierung fand sich im Vitamin B6-Mangel und in der Kontrollgruppe in gleicher Verteilung. Hinsichtlich des Vergleiches von Vitamin B6-Mangel- und Kontrolltieren zeigte sich insgesamt eine erstaunliche Übereinstimmung des Sialylierungsmusters (s. Tab. 11).

**Tab. 11: Verteilung sialylierter Strukturen bezogen auf die Gesamtglykane.**

	biantennär +/- fuc [%]		triantennär +/- fuc [%]		tetraantennär +/- fuc [%]		tetraantennär+ repeats +/- fuc [%]	
	Kontr.	Vitamin B6 Mangel	Kontr.	Vitamin B6 Mangel	Kontr.	Vitamin B6 Mangel	Kontr.	Vitamin B6 Mangel
A0	0,8	0,6	-	-	-	-	-	-
A1	7	8	1	1	-	-	-	-
A2	25	23	8	7	-	-	-	-
A3	14	16	6	6	-	-	-	-
A4	6	6	7	7	2	2	2	2
A5	-	-	4	4	3	3	2	2
A6	-	-	1	1	2	3	0,5	0,7