

Aus dem  
Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin  
Abteilung Biochemie  
Leiter: Prof. Dr. W. Reutter

**Einfluss eines in Ratten induzierten Vitamin B6-Mangels auf den  
Uracilnucleotidstoffwechsel in verschiedenen Organen und dessen  
Auswirkung auf die Glykosylierung von Plasmamembranproteinen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Kathrin Rieger**

aus Berlin

2003

**Referent:**

Prof. Dr. W. Reutter

**Korreferent:**

Priv.- Doz. Dr. M. Schaefer

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien  
Universität Berlin

Promoviert am: 05.09.03

MEINEN ELTERN  
UND  
MEINEM GROßVATER  
GEWIDMET

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Vitamin B6 .....	1
1.1.1. Struktur und biochemische Eigenschaften .....	1
1.1.2. Natürliche Quellen, Bedarf und Vitaminstatus .....	2
1.1.3. Aufnahme und Utilisierung .....	2
1.1.4. Abbau und Ausscheidung .....	3
1.1.5. Funktionen im Metabolismus .....	3
1.1.6. Therapeutische Bedeutung .....	7
1.1.7. Auswirkungen eines Vitamin B6-Mangels auf Organe .....	7
1.1.8. Alters- und zeitabhängiger Anstieg von Uracilnucleotiden in der Rattenleber unter Vitamin B6-Mangel .....	8
1.2. Veränderung des Glykosylierungsspektrums von Glykoproteinen bei erhöhten intrazellulären UDP-Zucker-Konzentrationen .....	10
1.2.1. Beeinflussung der Sialylierung von Glykoproteinen durch erhöhte Uracilnucleotid-Konzentrationen in Rattenhepatozyten .....	10
1.2.2. Beeinflussung der Komplexität von N-Glykanen durch den intrazellulären UDP-Zuckerpool in BHK-Zellen .....	10
<b>2. Grundlagen .....</b>	<b>11</b>
2.1. Uracilnucleotide .....	11
2.1.1. Uracilnucleotidbiosynthese .....	11
2.1.2. Regulation der de novo-Synthese .....	11
2.1.3. Synthese von Nucleotid-aktivierten Monosacchariden .....	13

2.1.4.	Funktionen der Uracilnucleotide und Uracilnucleotid-Zucker im Organismus .....	13
2.1.5.	Abbau und Reutilisierung der Uracilnucleotide .....	14
2.1.6.	Modell der intrazellulären Kompartimentierung der Uracilnucleotid-Biosynthese .....	14
2.2.	Glykoproteine .....	15
2.2.1.	Struktur von N-gebundenen Glykanen .....	15
2.2.2.	Struktur von O-gebundenen Glykanen .....	18
2.2.3.	Biologische Funktionen von N- und O-Glykanen .....	18
2.2.4.	Biosynthese von N-Glykanen .....	20
2.2.5.	Regulation der Synthese spezifischer N-gebundener Oligosaccharide von Glykoproteinen .....	20
2.2.6.	Biosynthese von O-Glykanen .....	21
<b>3.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>23</b>
4.1.	Isolierung und Analyse N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide aus der Rattenleber .....	23
4.1.1.	Übersicht über die Analysenstrategie der N-Glykane von Plasmamembranproteinen .....	23
4.1.2.	Gewinnung von Rohmembranhomogenat aus der Rattenleber .....	24
4.1.3.	Entfernung von Zellkernen und nicht-membrangebundenen Proteinen .....	24
4.1.4.	Gewinnung von Plasmamembranen aus der Rattenleber mittels Zonenzentrifugation .....	25
4.1.5.	Entfernung von Membranlipiden .....	27
4.1.6.	Enzymatische Methoden .....	27

4.1.6.1.	Trypsinverdau der Membranproteine .....	27
4.1.6.2.	Deglykosylierung mit PNGase F .....	28
4.1.6.3.	Desialylierung mit Neuraminidase .....	29
4.1.7.	Chromatographische Verfahren .....	30
4.1.7.1.	Trennung der neutralen N-Glykane mit Aminophase-HPLC .....	30
4.1.7.2.	Anionenaustausch-HPLC mit Mono Q-Säulenmaterial .....	31
4.1.7.3.	Monosaccharidanalyse mittels <i>High-Performance-Anion-Exchange Chromatography</i> mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) .....	32
4.1.8.	Chemische Verfahren .....	34
4.1.8.1.	Saure Hydrolyse von Oligosacchariden .....	34
4.1.8.2.	Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden mit 2-Aminobenzamid .....	34
4.1.8.3.	Bestimmung des Proteingehaltes der Membranaufarbeitungen nach Delipidierung .....	36
4.1.9.	Charakterisierung der N-Glykane durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	37
4.2.	Isolierung und Analyse von Nucleotiden aus unterschiedlichen Organen der Ratte .....	38
4.2.1.	Aufzucht und Haltung der Ratten .....	38
4.2.2.	Organentnahme mittels Gefrierstopptechnik.....	38
4.2.3.	Homogenisierung und Enteiweißung des Organmaterials .....	38
4.2.4.	Entfettung der Homogenisate .....	39
4.2.5.	Optisch-enzymatische Bestimmung der Konzentrationen von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP, UMP in verschiedenen Organen.....	40
4.2.6.	Bestimmung von 16 ausgewählten Nucleotiden und Nucleotidzuckern in Organhomogenisaten mittels Anionenaustausch-HPLC (SAX-HPLC) .....	43

<b>5.</b>	<b>Geräte, Chemikalien, Material .....</b>	<b>45</b>
5.1.	Geräte .....	45
5.2.	Chemikalien .....	47
5.2.1.	Enzyme und Substrate .....	47
5.2.2.	Lösungsmittel .....	48
5.2.3.	Radioaktivität .....	48
5.2.4.	Standardsubstanzen .....	48
5.3.	Material .....	48
5.3.1.	Austauscherharze .....	48
5.3.2.	Weitere Materialien .....	49
5.3.3.	Futtermittel .....	49
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
6.1.	Versuchsaufbau .....	50
6.2.	Versuchstiere .....	51
6.2.1.	Wachstum der Ratten .....	51
6.2.2.	Makroskopische Befunde der entnommenen Organe .....	52
6.3.	Teilprojekt I: Nucleotidkonzentrationen in verschiedenen Organen der Ratte unter Vitamin B6-Mangel .....	52
6.3.1.	Konzentrationsbestimmung von 16 Nucleotiden und Nucleotid- zuckern mit Anionenaustausch-Chromatographie (SAX-HPLC) und enzymatisch-photometrische Konzentrationsbestimmung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP, UMP in verschiedenen Organen .....	52
6.4.	Teilprojekt II: Nucleotidkonzentrationen in Rattenlebern unter dem Einfluss eines Glucocorticoidmangels bzw. Glucocorticoid- überschusses .....	62

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.....	62
6.5.	Teilprojekt III: Isolierung und Analyse N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide von Zellmembranen Vitamin B6-defizienter Ratten .....	65
6.5.1.	Isolierung und Analyse von Rohmembranglykoproteinen aus der Rattenleber .....	65
6.5.1.1.	Bestimmung des Proteingehaltes nach Delipidierung der Rohmembranen .....	65
6.5.1.2.	Monosaccharidanalyse der Rohmembranglykane .....	65
6.5.1.3.	Massenbestimmung der Rohmembranglykane mit MALDI-TOF-MS .....	66
6.5.2.	Isolierung und Analyse von Plasmamembran-Glykoproteinen aus der Rattenleber .....	67
6.5.2.1.	Bestimmung des Proteingehaltes nach Delipidierung der Plasmamembranen .....	67
6.5.2.2.	Monosaccharidanalyse der Plasmamembranglykane .....	68
6.5.2.3.	Charakterisierung der neutralen Oligosaccharide der Plasmamembranproteine .....	70
6.5.2.3.1.	Enzymatische Deglykosylierung der Plasmamembran- und Rohmembranglykoproteine .....	70
6.5.2.3.2.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie der neutralen Oligosaccharide.....	71
6.5.2.3.3.	Trennung der N-Glykane mit Aminophase-HPLC .....	72
6.5.2.3.4.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie der Aminophase-Fractionen der Plasmamembranglykane .....	74
6.5.2.4.	Charakterisierung der geladenen Oligosaccharide der Plasmamembran .....	77
6.5.2.4.1.	Trennung der geladenen Oligosaccharide über Anionenaustausch-HPLC (Mono Q) .....	77



6.5.2.4.2.	Rechromatographie der einzelnen Mono Q-Fractionen mit Amino- phase-HPLC nach Desialylierung .....	79
6.5.2.4.3.	Massenbestimmung der desialylierten Mono Q-Fractionen mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	81
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
7.1.	Nucleotidkonzentrationen in der Leber, Niere, Herz, Lunge und Gehirn Vitamin B6-defizienter Ratten .....	82
7.2.	Nucleotidkonzentrationen in der Leber Vitamin B6-defizienter Ratten unter dem Einfluss eines absoluten Glucocorticoidmangels bzw. Glucocorticoidüberschusses .....	85
7.3.	Membranglykosylierung der Rattenleber unter dem Einfluss eines Vitamin B6-Mangels und konsekutivem Überangebot von Uracil- nucleotiden .....	87
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>

## **Anhang**

Danksagung