

4. Methoden

4.1. Isolierung und Analyse N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide aus der Rattenleber

4.1.1. Übersicht über die Analysenstrategie der N-Glykane von Plasmamembranproteinen

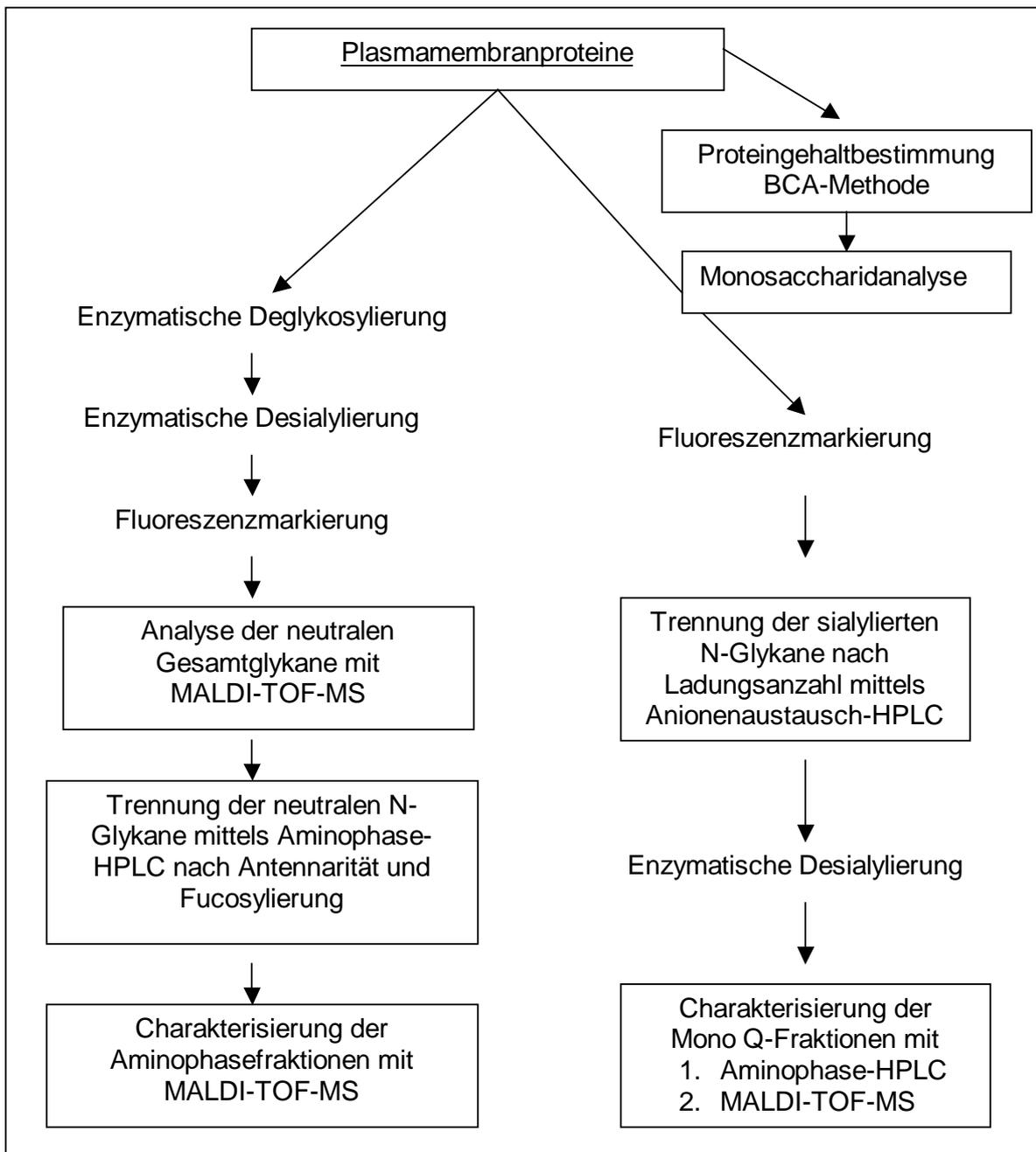


Abb. 5: Übersicht über die Analysenstrategie

4.1.2. Gewinnung von Rohmembranhomogenat aus der Rattenleber

Reagenzien:

Lebermedium¹: 0,5 mM CaCl₂
 1 mM NaHCO₃
 Proteaseinhibitor: 100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
 pH 7

Durchführung:

Die Lebern wurden am 35. Lebenstag entnommen, innerhalb der Gruppen gepoolt und in zwei getrennten Ansätzen aufgearbeitet. Für die Gewinnung von Rohmembranen wurden Rattenlebern durch eine Embryonenquetsche gepresst, um vom Bindegewebe getrennt zu werden. Der in der Quetsche verbliebene Bindegewebsstrang wurde zur Quantifizierung des eingesetzten Lebergewebes ausgewogen und entfernt. Der Organbrei wurde in 20 ml Lebermedium aufgenommen und im Dounce-Homogenisator mit 25 Hüben pro Füllung homogenisiert. Das so gewonnene Homogenat wurde in 700 ml Lebermedium aufgenommen und zur Abscheidung von Bindegewebsresten über eine Gazeschicht filtriert.

4.1.3. Entfernung von Zellkernen und nicht-membrangebundenen Proteinen

Zur Abscheidung der Zellkerne wurde das Leberhomogenisat für 10 min bei 400 x g (4 °C) zentrifugiert. Hierbei setzten sich die Zellkerne als Pellet ab und der die Membranen enthaltende Überstand konnte abdekantiert werden. Im nun folgenden Zentrifugationsschritt wurden freie, nicht im Membranverband befindliche Proteine abgetrennt. Hierzu wurde der oben gewonnene Überstand für 20 min bei 3.000 x g (4 °C) zentrifugiert. Der die freien Proteine enthaltende Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet in 200 ml Lebermedium aufgenommen und erneut mit 15 Hüben pro Fraktion gedounced. Die homogene Lösung wurde nun für 20 min unter Kühlung (4 °C) bei 100.000 x g zentrifugiert, das Pellet nach Abtrennung des Überstandes in aq. bidest. aufgenommen.

¹ Die Reagenzien wurden eisgekühlt verwandt; die Aufarbeitung fand unter Eiskühlung statt.

4.1.4. Gewinnung von Plasmamembranen aus der Rattenleber mittels Zonenzentrifugation

Prinzip:

Um die Plasmamembran isoliert zu gewinnen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt [74]. Hierbei macht man sich die unterschiedliche Schwere der Membranen beim Wandern durch einen Saccharosegradienten zu Nutze. Die Plasmamembran wandert während der Zentrifugation mit der größten Geschwindigkeit und bleibt in einem Bereich des Saccharosegradienten mit gleicher Dichte liegen. Durch Gewinnung der Saccharoselösung in diesem Bereich konnte die Plasmamembran isoliert gewonnen werden.

Lösungen:

Spüllösung:	0,9% NaCl und 0,5 mM CaCl ₂
Saccharoselösungen (w/w):	19%; 45%; 48,8% und 50%
Lebermedium:	1 mM NaHCO ₃ und 0,5 mM CaCl ₂ , pH 7,0

Durchführung:

Den Ratten wurde in Ethernarkose die Bauchhöhle eröffnet und die Leber über die A. hepatica communis mit isotoner Kochsalzlösung bis zur Blutleere perfundiert. Die Leber wurde entnommen, in eisgekühlte 0,9%iger NaCl-Lösung gebracht und gewogen. Nun wurde das Material durch eine Embryonenquetsche gepresst, im 10-fachen Volumen Lebermedium aufgenommen und im Dounce-Homogenisator mit 30 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Lebermedium 1:100 verdünnt; es resultierte ein Endvolumen von 2 l verdünnten Homogenates. Dieses wurde durch eine 4-lagige Gageschicht filtriert, für 20 min bei 2.800 rpm zentrifugiert, das Pellet auf Eis aufbewahrt und der Überstand verworfen.

Der Zonalrotor wurde gestartet und bei offenem Deckel mit 2.500 rpm rotiert. Die Befüllungsvorrichtung wurde montiert. Durch einen Gradientenmischer (Fa. Kontron) wurde ein Saccharosegradient von 19-35% hergestellt, der mittels einer Schlauchpumpe über die äußere Linie in den Rotor gefüllt wurde. Danach wurde 45%ige Saccharoselösung unterschichtet. Nun wurde der Rotor über die innere Linie mit dem Leberhomogenat befüllt. (s. Abb. 6)

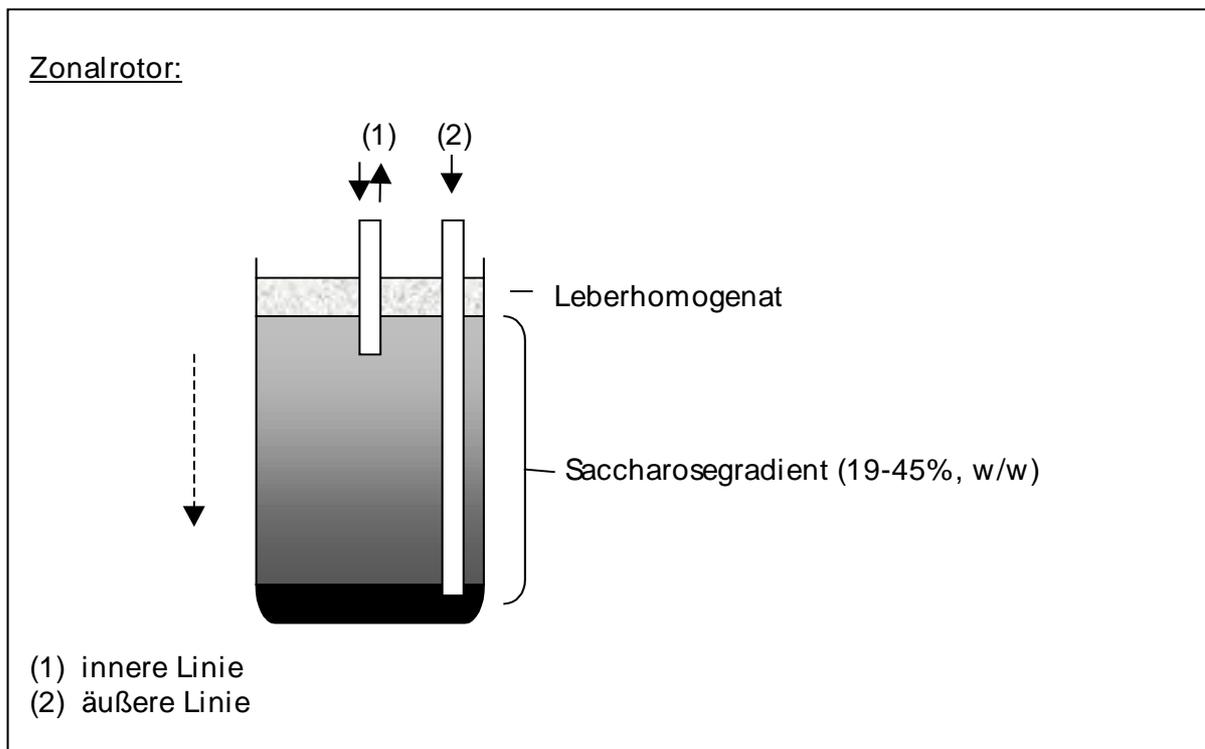


Abb. 6: Schematische Darstellung des Zonalrotors für die Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von Plasmamembranen. Die äußere Linie (2) dient der Befüllung des Rotors mit dem Gradienten. Über die innere Linie (1) tritt das Membranmaterial in der Gradientenlösung aus. Der unterbrochene Pfeil bezeichnet den Vektor für die Wirkung der Zentrifugationskraft und damit die Wanderungsrichtung der Membranen.

Das in 200 ml Lebermedium resuspendierte Pellet (s. o.) wurde über die innere Linie des mit dem Saccharosegradienten gefüllten Zonalrotors eingespritzt, mit 200 ml Lebermedium überschichtet und bei 5.000 rpm für 19 min zentrifugiert. Über die äußere Linie wurde 45%ige Saccharoselösung eingefüllt, so dass über die innere Linie zunächst das Lebermedium, dann ein Teil des Gradienten austrat. Die Konzentration des austretenden Saccharosegradienten wurde fortlaufend refraktometrisch bestimmt. Im Bereich bis 35% eluierten die Membranen des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums aufgrund der geringeren Wanderungsgeschwindigkeit. Die Plasmamembranen traten im Saccharosegradienten von 37% bis 41,5% aus, wurden gesammelt und mit Lebermedium auf 300 ml verdünnt. Die Plasmamembranen wurden aus dieser Lösung für 20 min bei 18.000 rpm abzentrifugiert und mehrfach mit Lebermedium gewaschen, um den Saccharosegradienten weitgehend zu entfernen.

4.1.5. Entfernung von Membranlipiden

Reagenzien: Chloroform p.a.

Methanol p.a.

Ethanol p.a.

Biomembranen bestehen etwa zur Hälfte aus Phospholipiden, in welchen die Membranproteine nach dem Fluid-Mosaic-Modell eingebettet liegen. Im Folgenden wurden nun die Membranproteine vom Lipidanteil der Membran nach einer Modifizierung der Methode von Svennerholm und Fredmann getrennt [75].

Durchführung:

Jeweils drei Volumenteile Membransuspension wurden für die Entfettung mit 10 Volumenteilen Methanol versetzt, auf dem Vortex-Mixer vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurden 10 Volumenteile Chloroform zugesetzt, gemischt und für 20 min unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Gemisch wurde bei 40.000 x g für 20 min zentrifugiert, die Überstände mit den darin gelösten Membranlipiden dekantiert und verworfen. Die Delipidierungsprozedur wurde noch einmal wiederholt. Die so gewonnenen Pellets wurden im 10-fachen Volumen Ethanol im Ultraschallbad resuspendiert und gewaschen. Es lösten sich in diesem Arbeitsschritt verbliebene Lösungsmittelreste in Ethanol und wurden durch Zentrifugation bei 20.000 x g (4 °C) für 20 min vom Membranpellet getrennt. Der Waschvorgang wurde im Anschluss noch einmal wiederholt. Zur Entfernung des Ethanols wurde das Pellet zweimalig mit dem 10-fachen Volumen aq. bidest. resuspendiert und zentrifugiert. Der im wässrigen Überstand enthaltene Ethanolanteil wurde verworfen.

4.1.6. Enzymatische Methoden

4.1.6.1. Trypsinverdau der Membranproteine

Um die N-Glykane vom Proteinanteil abzutrennen, wurden sie mit Peptid-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl-) Asparagin-amidase F (PNGase F) verdaut. Zur vollständigen Abspaltung der N-Glykane durch PNGase F musste jedoch gewährleistet sein, dass das Enzym alle Glykosylierungsstellen erreicht. Um mögliche sterische Behinderungen durch die Orientierung der Polypeptidketten in wässriger Lösung zu

verhindern, wurde dem PNGase F-Verdau der Verdau mit Trypsin vorangestellt. Trypsin spaltet die Polypeptidkette hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin. Die so erhaltenen Glykopeptide waren nun dem PNGase F-Verdau zur vollständigen Deglykosylierung zugänglich. Bei dieser Methode konnte auf die Zugabe von Detergenzien verzichtet werden [76].

Durchführung:

Das salzfreie Trypsinlyophilisat wurde in 1%iger Essigsäure gelöst, um während der Lagerung vor Selbstverdau geschützt zu sein. Die zu spaltenden Membranglykoproteine wurden in 100 mM N-Methyl-2,2'-iminodiethanol-trifluoracetatpuffer (pH 8,2) aufgenommen. Die Trypsinlösung wurde im Verhältnis Trypsin/Protein 1/50 (w/w) den Membranproteinen zugesetzt und zunächst für 5 h bei 37 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zugabe gleicher Mengen Trypsins wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgeführt. Der Trypsinverdau wurde durch 3-minütiges Erhitzen des Ansatzes bei 95 °C im Thermomixer beendet.

4.1.6.2. Deglykosylierung mit PNGase F

Die Peptid-N-Glykosidase F spaltet spezifisch N-Glykane vom Asparaginrest des Peptides ab [77].

Durchführung:

Zunächst wurde die in Natriumphosphatpuffer (100 mM; pH 7,2) vorliegende PNGase F in N-Methyl-2,2'-iminodiethanol-trifluoracetatpuffer (pH 8,2) umgepuffert. Als tertiäres Amin konnte dieser Puffer später in der Vakuumzentrifuge rückstandsfrei aus der Lösung abgezogen werden. Die Umpufferung erfolgte durch Mikrozentrifugation in Centricon-Filtersystemen (Centricon 10) mit N-Methyl-2,2'-iminodiethanol-trifluoracetatpuffer bei 3.000 x g. Die PNGase F wurde nun der Lösung der glykosylierten tryptischen Peptide im Verhältnis 7 mU/10 mg Protein in einem Gesamtvolumen von 400 µl zugegeben und für 18 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Thermomixer inkubiert. Nach 18 h wurde erneut die gleiche Enzymmenge zugegeben und für weitere 48 h inkubiert.

Zur Reinigung der N-Glykane von Protein- und Peptidresten wurden die Proben über ein Kationenaustauscherharz gegeben, an der die Peptide und Proteine zurückgehalten wurden, während die N-Glykane frei eluierten. Hierzu wurde 1 ml

gewaschenes Kationenaustauscherharz in Poly Prep-Chromatographie-Säulen (Fa. Bio-Rad) verbracht und gründlich mit aq. bidest. gespült. Vorbereitend wurden die Proben mit 1%iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 3,5 titriert, um die Peptide in die protonierte, kationische Form zu überführen. Nach Auftragen der Proben auf die Austauschersäule wurde diese mit dem 8-fachen Bettvolumen aq. bidest. eluiert. Die Eluate wurden in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt.

4.1.6.3. Desialylierung mit Neuraminidase

Ein Teil der N-Glykane trägt endständig N-Acetyl-neuraminsäurereste und zählt, ebenso wie Sulfonsäure-tragende N-Glykane, zu den sauren Oligosacchariden. Um die Oligosaccharide nach ihrer antennären Struktur und ihrer Fucosylierung mittels Aminophase-HPLC auftrennen zu können (s.u. 4.1.7.1.), mussten bei je einem Aliquot der Proben die Sialinsäurereste enzymatisch abgespalten werden. Die so gewonnenen neutralen Oligosaccharide konnten dann mit Aminophase-HPLC und MALDI-TOF-MS vermessen werden.

Durchführung:

Die zur Trockne eingengten Oligosaccharide wurden mit 100 µl Natriumphosphatpuffer (25 mM; pH 5) aufgenommen und mit 100 mU Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* versetzt. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Thermomixer. Um die neutralen N-Glykane für die weitere Aufarbeitung zu entsalzen und von Enzymprotein zu trennen, wurden sie über ein Mischbett gegeben. Hierzu wurden 500 µl Anionenaustauscherharz (AG 3-XA4, OH⁻-Form) in eine Poly Prep-Chromatographie-Säule verbracht und mit 500 µl Kationenaustauscherharz (AG 50W-X12, H⁺-Form) überschichtet. Die Probe wurde, nach Auftragen auf das Mischbett, mit dem 5-fachen Bettvolumen aq. bidest. eluiert und anschließend in der Vakuumzentrifuge eingengt.

4.1.7. Chromatographische Verfahren

4.1.7.1 Trennung der neutralen N-Glykane mit Aminophase-HPLC

An der Aminophase werden die ungeladenen N-Glykane im Acetonitril-Wasser-Gradienten aufgrund ihrer polaren Interaktion mit der hydrophilen Matrix nach Anzahl ihrer Antennen und Fucosylierung aufgetrennt [78]. Dabei eluieren biantennäre Glykane zuerst, gefolgt von triantennären und tetraantennären Glykanen. Die fucosylierten Glykane eluieren in der Regel nach den jeweiligen nicht-fucosylierten Glykanen gleicher Antennarität. Als externer Standard zur Bestimmung der Retentionszeiten dienten die neutralen, 2-AB-markierten N-Glykane aus α_1 -saurem Glykoprotein. Das aufgetragene Probenvolumen betrug jeweils 50 μ l, die 2-AB-markierten N-Glykane wurden fluoreszenzspektrometrisch detektiert. Die einzelnen Fraktionen wurden separat gesammelt und für weitere Analysen in der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Die Identifizierung der neutralen N-Glykane erfolgte zunächst über das Elutionsprofil in der Aminophase-HPLC und wurde zusätzlich durch massenspektrometrische Daten vervollständigt.

Säule:	APS-2 Hypersil (4 x 250 mm, Korngröße 3 μ m, Bischoff)
Eluent A:	15 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,2
Eluent B:	Acetonitril p.a.
Flussrate:	1,5 ml/min
Detektion:	Shimadzu Fluoreszenz-Spektrometer RF-535
Fluoreszenz:	λ ex = 330 nm, λ em = 420 nm
Range:	1
Response time:	1,5 s
Sensitivity:	high

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% Eluent B
0	100
1(*)	100
11	80
101	50
105	30
110	30
111	100
120	100

(*): Zeitpunkt der Injektion

Herstellung der Eluenten:

Natriumdihydrogenphosphat wurde in aq. bidest. gelöst und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf pH 5,2 titriert. Die Endkonzentration des Puffers betrug 15 mM Phosphat. Die Lösung wurde über eine Millipore-Filteranlage (Filter Typ HV; 0,45 µm Porengröße) von Schwebstoffen gereinigt und mittels einer Vakuumpumpe sorgfältig entgast. Acetonitril wurde über einen Millipore-Filter (Typ FH; 0,5 µm Porengröße) gereinigt und im Ultraschallbad entgast.

4.1.7.2. Anionenaustausch-HPLC mit Mono Q-Säulenmaterial

Bei der Anionenaustausch-Chromatographie wurden die Sialinsäure-tragenden Oligosaccharide nach Anzahl ihrer Ladungen getrennt.

Säule: Mono Q (HR 5/5, 10 x 0,5 cm, Pharmacia)
Eluent A: 0,6 M Ammoniumacetat, pH 7,0
Eluent B: aq. bidest.
Flussrate: 1 ml/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% Eluent B
0	100
1(*)	100
5	100
65	65
67	0
77	0
78	100
98	100

(*): Zeitpunkt der Injektion

4.1.7.3. Monosaccharidanalyse mittels *High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography* mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)

Die HPAEC-PAD kann in Verbindung mit der sauren Hydrolyse der Oligosaccharide zur qualitativen und quantitativen Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung von Glykanen angewendet werden [80]. Bei der gepulsten amperometrischen Detektion (PAD) wird die Änderung des Stromes in einer Messzelle gemessen, durch welche die Monosaccharide nach Durchlaufen der Trennsäule fließen. Der Strom entsteht durch Oxidation oder Reduktion der im Eluat enthaltenen Monosaccharide an der Oberfläche einer Arbeitselektrode. Die Pulsung des angelegten Potentials führt zu einer höheren Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit und verhindert eine elektrochemische Verschmutzung der Elektrode.

Eluent A:	15 mM NaOH
Eluent B:	200 mM NaOH
Eluent C:	100 mM NaOH
Zumischung:	500 mM NaOH
Flussrate:	1 ml/min
Säule:	Dionex Carbo Pac PA-1 (4 x 250 mm)
Vorsäule:	Aminotrap und Vorsäule für Carbo-Pac PA-1
Probengeber:	Abimed 231
Injektionsvolumen:	50 µl

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% Eluent A	% Eluent B	% Eluent C
0(*)	100	0	0
25	100	0	0
26	0	0	100
36	0	0	100
37	0	100	0
47	0	100	0
48	100	0	0
60	Restart		

(*): Zeitpunkt der Injektion

Integration: 0,20-0,40 ms

E1 = 0,05 Volt 0,00-0,40 ms

E2 = 0,75 Volt 0,41-0,60 ms

E3 = -0,15 Volt 0,61-1,00 ms

Standardmonosaccharidgemisch:

Desoxyribose 2 nmol

N-Acetyl-D-glucosamin 1 nmol

D-Fructose 2 nmol

N-Acetyl-D-galaktosamin 1 nmol

D-Glucose 1 nmol

D-Mannose 1 nmol

L-Fucose 1 nmol

D-Galaktose 1 nmol

Durchführung:

Je 50 µl Probe wurden durch einen automatischen Probengeber injiziert. Es erfolgten Doppelbestimmungen der Proben; nach je zwei Proben erfolgte die Messung eines Standardgemisches bekannter Zusammensetzung als externer Standard. Als interner Standard dienen 2 nmol Fucose und 2 nmol Desoxyribose, die bereits nach der sauren Hydrolyse zugefügt wurden (s.u. 4.1.8.1.).

4.1.8. Chemische Verfahren

4.1.8.1. Saure Hydrolyse von Oligosacchariden

Chemikalien: 4 N Trifluoressigsäure (TFA)

Zur Monosaccharidanalyse mit HPAEC-PAD wurden die Oligosaccharide sauer hydrolysiert. Hierzu wurden die Proben in 200 µl aq. bidest. aufgenommen und mit 200 µl 4 N TFA versetzt. Die Hydrolyse erfolgte in verschraubbaren Glasgefäßen mit Teflondichtungen (2,5 ml Wheaton) für 4 h bei 100 °C im Heizblock. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde pro Analyse ein interner Standard von je 2 nmol Fructose und Desoxyribose zur Bestimmung der Verluste bei der Einengung zugesetzt. Die Proben wurden nun zur Trockne eingeeengt, und die leicht flüchtige TFA entzogen. Zur vollständigen Entfernung der TFA wurden die Proben erneut mit 400 µl aq. bidest. aufgenommen und zur Trockne eingeeengt. Die Proben konnten, in dieser Weise vorbereitet, mit HPAEC-PAD vermessen werden.

4.1.8.2. Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden mit 2-Aminobenzamid

Für die Fluoreszenzmarkierung der sialylierten und desialylierten Oligosaccharide wurde der Signal™ 2-AB-Labeling-Kit K-404 der Firma Oxford Glyco Sciences verwendet. Es wurden hierbei sowohl N-Glykane, als auch O-Glykane markiert. Die Reaktion beruht auf der Eigenschaft aromatischer Amine, mit Aldehydfunktionen (in diesem Falle der Hexosen von Glykanstrukturen) unter Abspaltung von Wasser Schiffsche Basen zu bilden. Um eine quantitative Markierung zu erreichen, wurde Natriumcyanoborhydrid dem Reaktionsgemisch zugeführt, welches als starkes Reduktionsmittel die Schiffsche Base zu einem sekundären Amin reduziert und somit das Produkt dem Gleichgewicht entzieht. Eine Reduktion von Aldehyd zu Alkohol wurde nicht beobachtet.

Chemikalien und Material:

- Signal™ 2-AB-Labeling-Kit K-404:
 - Vial A: Farbstoff 2-Aminobenzamid (2-AB)
 - Vial B: DMSO (Dimethylsulfoxid)
 - Vial C: Eisessig
 - Vial D: Reduktionsmittel NaCNBH₃ (Natriumcyanoborhydrid)

- Luer-Lock-Einwegspritze 3 ml
- Millex Filter HV4 (0,45 µm, Millipore)
- Papierstreifen zur Papierchromatographie (2,5 x 10 cm)
- Elutionsmittel: Butanol/Ethanol/Wasser 4:1:1
- Chromatographiekammer

Durchführung:

Die Herstellung des Labelling-Reaktionsgemisches erfolgte gemäß der im Kit angegebenen Instruktionen. Ein Aliquot der Probe (maximal 50 nmol Oligosaccharide) wurde in einem verschraubbaren 500 µl Plastikvial in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt. Zu jeder Probe wurden nun 10 µl des Reaktionsgemisches gegeben, auf dem Vortex-Mixer gemischt und herunterzentrifugiert. Die Ansätze wurde dann unter Lichtausschluss bei 65 °C für 2 h im Thermomixer inkubiert. Die derivatisierten Proben wurden im Anschluss auf einen Papierstreifen aufgetragen und im Abzug über Nacht getrocknet. Die Chromatographiekammer wurde mit Elutionsmittel voräquilibriert und für die Entwicklung der Papierstreifen mit neuem Elutionsmittel befüllt. Die trockenen Papierstreifen wurden in die Kammer eingehängt, so dass sie etwa 1 cm in das Elutionsmittel hineinragten, der Auftragungspunkt der Probe jedoch nicht direkt benetzt wurde. Nach 60 min war die Entwicklung abgeschlossen und die Lösungsmittelfront am oberen Rand des Streifens angelangt. Es erfolgte ein erneutes Trocknen der Streifen über Nacht. Unter UV-Licht-Kontrolle konnte nun ungebundener Farbstoff, welcher mit dem Elutionsmittel gewandert war, abgeschnitten werden. Die 2-AB-markierten Oligosaccharide verblieben gereinigt am Auftragungsort. Um die Glykane vom Papier zu eluieren, wurden die Abschnitte, die die Probe trugen, in Luer-Lock-Spritzen verbracht, mit 1 ml aq. bidest. befüllt und durch den auf die Spritze aufgeschraubten Filter filtriert. Hierzu wurden die Spritzen in Zentrifugenröhrchen gehängt und bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt, um die Oligosaccharide vollständig auszuwaschen. Die sauberen, 2-AB-markierten Glykane wurden in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt.

4.1.8.3. Bestimmung des Proteingehaltes der Membranaufarbeitungen nach Delipidierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der delipidierten Membranaufarbeitungen erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Assay [79].

Prinzip:

Bicinchoninsäure bildet mit Kupferionen (Cu^+) einen stabilen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der zu testenden Probe werden Cu^{2+} -Ionen als 4%- CuSO_4 -Lösung und Bicinchoninsäure in stark alkalischer Lösung (0,2 N NaOH) zugeführt. Die in der Probe enthaltenen Proteine und Peptide reduzieren Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen und es bildet sich mit Bicinchoninsäure ein farbiger Komplex. Dieser wird dann mit einem ELISA-Reader bei 562 nm vermessen. Für die quantitative Auswertung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin, BSA) erstellt.

Reagenzien: BCA-Protein-Reagent-Assay

Durchführung:

Aus einer Stammlösung von 2 mg/ml BSA wurden Verdünnungen von 1-3 μg , 4 μg , 6 μg , 8 μg und 10 μg / 20 μl zur Erstellung einer Eichgerade hergestellt und mit 0,2% SDS versetzt.

Probenvorbereitung:

Von jedem Aliquot Proteinlösung wurden Verdünnungsreihen hergestellt (1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 sowie 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80). Die Verdünnungsansätze wurden mit Detergenz (jeweils 0,2% SDS) versetzt, um die Membranproteine in wässrige Lösung zu bringen. Auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden zunächst je 20 μl der Standardlösungen pipettiert. Von den Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen gemessen. Den so vorgelegten Probenaliquots wurden nun je 200 μl frisch hergestellten Reaktionsreagenzes mit einer Multikanalpipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) zugeführt, und die Platte für 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

Auswertung:

Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei 562 nm vermessen und anhand der erstellten Eichkurve (BSA) quantitativ ausgewertet.

4.1.9. Charakterisierung der N-Glykane durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die matrixunterstützte Laserabsorptions-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) erlaubt eine Massenbestimmung von Molekülen bis in den picomol-Bereich. Es lassen sich mit der MALDI-TOF-MS Moleküle bis zu einer Größe von 500.000 Da vermessen; eine aufwendige Probenvorbereitung ist nicht nötig. Die Proben müssen ungeladen und möglichst salzarm vorliegen [81].

Kristallisationsmatrix:	DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) in Ethanol/ aq. bidest. (9:1)
Kalibrierungssubstanz:	Dextranhydrolysat
Reflektorspannung:	20 kV
Beschleunigungsspannung:	19,5 kV

Durchführung:

Die Probe wurde in aq. bidest. gelöst (ca. 1-20 pmol Oligosaccharide/ μ l) und 1:1 mit der Matrix gemischt. Es wurden 0,5-1 μ l Probe auf eine Trägerplatte (Target) aus Edelstahl aufgetragen und bei Raumtemperatur auskristallisiert. Das Target wurde dann in die Hochvakuum-Messkammer eingebracht.

Prinzip:

Mit einem Laser werden Probenteilchen aus der Probenschicht heraus beschleunigt, laden sich hierbei mit Na^+ und K^+ auf, und werden, in dem von einer Ringelektrode erzeugten elektrischen Feld, weiter beschleunigt. Die Probenteilchen bewegen sich dann im Hochvakuum auf einer Strecke von 100 cm zum Detektor. Gemessen wird die Flugzeit der Partikel, welche mit einem Standardgemisch (Dextranhydrolysat) bekannter Massen verglichen wird, mit der das Gerät vor jeder Messreihe kalibriert wird. Da die verschiedenen Strukturen innerhalb der Matrix unterschiedliche Kristallisationsverhalten aufweisen, ist diese Methode nicht zur quantitativen Analyse anwendbar, zur Quantifizierung und weiteren Charakterisierung der Glykane erfolgte die chromatographische Auftrennung mit Aminophase-HPLC.

4.2. Isolierung und Analyse von Nucleotiden aus unterschiedlichen Organen der Ratte

4.2.1. Aufzucht und Haltung der Ratten

Für die Untersuchungen wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht herangezogen. Die Tiere wurden nach der Geburt für 21 Tage beim Muttertier belassen. Danach wurden sie vom Muttertier getrennt. Die Kontrollgruppe wurde für zwei Wochen mit vollwertiger Haltungsdiät (Altromin 1321; Fa. Altromin, Lage/ Deutschland), die Testgruppe mit Vitamin B6-Mangelfutter ($\leq 0,6$ mg Pyridoxin/kg; Fa. Hoffmann-La Roche, Schweiz) ernährt, H₂O ad libitum. In den Tierställen wurde ein natürlicher Tag-/Nachtrhythmus erzeugt; die Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit wurden konstant gehalten. Sowohl die aufgenommene Nahrungsmenge, als auch das Gewicht der Tiere wurden täglich ermittelt.

4.2.2. Organentnahme mittels Gefrierstoptechnik

Die Tiere wurden zunächst mit Nembutal (30 mg Nembutal/ml PBS) intraperitoneal narkotisiert. Der Situs wurde über einen längs in der Medianlinie geführten Bauchschnitt eröffnet. Die zu entnehmenden, gut perfundierten Organe wurden vorsichtig freipräpariert und schließlich mit einer, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange entnommen und schockgefroren. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff bis zu ihrer Aufarbeitung gelagert. Dieses Vorgehen ermöglichte es, den rasch nach Erliegen der Perfusion einsetzenden Abbau von Nucleotiden zu verhindern [82]. Die Organentnahme erfolgte stets in der gleichen Reihenfolge (1. Leber, 2. Nieren, 3. Herz, 4. Lungen, 5. Gehirn), wobei vom Beginn der Entnahme des ersten Organs bis zur Entnahme des letzten Organs eines Tieres maximal 40 s verstrichen.

4.2.3. Homogenisierung und Enteiweißung des Organmaterials

Die Homogenisierung und Enteiweißung der Gewebe erfolgte in Anlehnung an die Methode von Keppler et al. (1974) [83].

Reagenzien: 0,9%-Perchlorsäure

Durchführung:

Sämtliche Aufarbeitungsschritte fanden unter Eiskühlung statt; verwandte Lösungen waren vorgekühlt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Organe (0,9-1,5 g) wurden gewogen, mit 4 ml 0,9%-Perchlorsäure versetzt und durch ein rotierendes Pistill (1500 U/min) bis zur Auflösung des Organverbandes homogenisiert. Der ausgefallene Eiweißanteil wurde durch Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 10 min als Niederschlag abgeschieden. Der saure Überstand wurde dekantiert und mit festem KHCO_3 neutralisiert, bis sich ein pH-Wert von 7-8 einstellte. Der Kaliumperchlorat-Niederschlag wurde bei 1.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.4. Entfettung der Homogenisate

Die aus der Homogenisierung und Enteiweißung hervorgegangenen Proben mussten für die Bestimmung mittels Anionenaustausch-HPLC entfettet werden. Hierzu wurden jeweils 500 µl Probe in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen gebracht. Um die Verluste an Nucleotiden bei der Entfettung quantifizieren zu können, wurde eine definierte Menge an ^{14}C -GDP-Fucose als interner Standard zugegeben. Die Ansätze wurden nun mit aq. bidest. auf ein Volumen von 1,2 ml gebracht, mit 2 ml Methanol versetzt und gründlich auf dem Vortex-Mixer vermischt. Nun wurde das Gemisch mit 4 ml Chloroform versetzt und erneut auf dem Vortex-Mixer gemischt. Es wurde letztlich ein Delipidierungsgemisch von aq. bidest./Methanol/Chloroform 3:5:10 (v/v) eingesetzt [84]. Zur scharfen Trennung der wässrigen und der organischen Phase wurde nun für 5 min bei 3.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Aus der wässrigen, leichteren Phase, in der die Nucleotide gelöst vorlagen, wurden nun 1,5 ml abgenommen und auf Centricon 10-Filtersysteme übertragen. Das Gesamtvolumen der wässrigen Phase wurde durch vorsichtiges Abpipettieren ermittelt. Die Proben wurden nun bei 3.000 x g und 4 °C filtriert und von größermolekularen Reststoffen gereinigt. In der Vakuumzentrifuge wurde der verbliebene Methanolanteil aus der wässrigen Lösung abgezogen und die Proben auf ein Volumen von 300 µl eingengt. Bis zur Vermessung mittels Anionenaustausch-HPLC wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

4.2.5. Optisch-enzymatische Bestimmung der Konzentrationen von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP, UMP in verschiedenen Organen

Prinzip:

Es handelt sich bei der verwandten Methode um einen gekoppelten enzymatischen Test, der es ermöglicht, die oben genannten Nucleotide einer Probe in einer Küvette hintereinander zu vermessen. Die beiden Substanzen NAD^+ und NADH bilden ein physiologisches Redoxsystem mit unterschiedlichen Absorptionsspektren (s. Abb. 7). In der unter 1) der Abb. 8 aufgeführten Reaktionsabfolge wird NAD^+ zu NADH reduziert, das spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert wurde. Durch Kopplung der folgenden (*per se* nicht NAD^+ / NADH -abhängigen Reaktionen) an dieses Redoxsystem lassen sich indirekt auch die anderen Substanzen quantitativ nachweisen [85].

Die Berechnung der Konzentrationen der Substrate aus den gemessenen Extinktionswerten erfolgte nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\Delta E = \log 1/D = \epsilon \times c \times d \quad c = \Delta E / \epsilon \times d$$

E = Extinktion

d = Schichtdicke

c = Konzentration

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

Bei der Berechnung musste berücksichtigt werden, dass pro mol UDP-Glc bzw. UDP-Gal, UTP, UDP oder UMP 2 Mole NADH gebildet wurden.

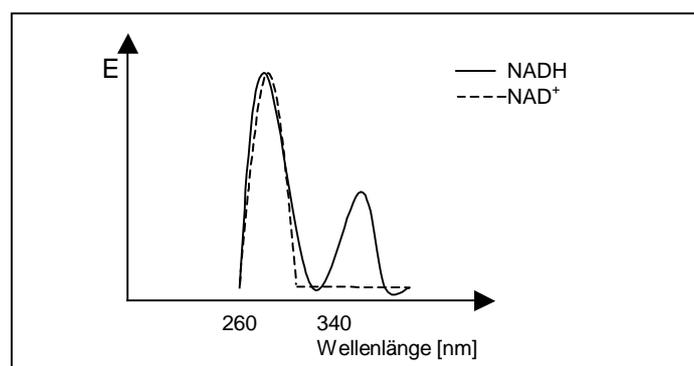


Abb. 7: Darstellung der Absorptionsspektren des Redoxsystems NAD^+ / NADH . Das reduzierte NADH besitzt neben dem gemeinsamen Absorptionsmaximum bei 260 nm ein weiteres bei 340 nm (Chinonring), wodurch die separate Messung dieser Substanz ermöglicht wird.

Lösungen:

Glycin-Puffer:	500 mM; pH 8,7
NAD ⁺ /Glycin/EDTA:	500 mM Glycin; 4,5 mM NAD ⁺ ; 8 mM EDTA
Glc-1-P/(MgCH ₃ CO ₂) 4 H ₂ O:	510 mM Glc-1-P; 510 mM (MgCH ₃ CO ₂) 4 H ₂ O
ATP/Glycin:	110 mM ATP; 500 mM Glycin

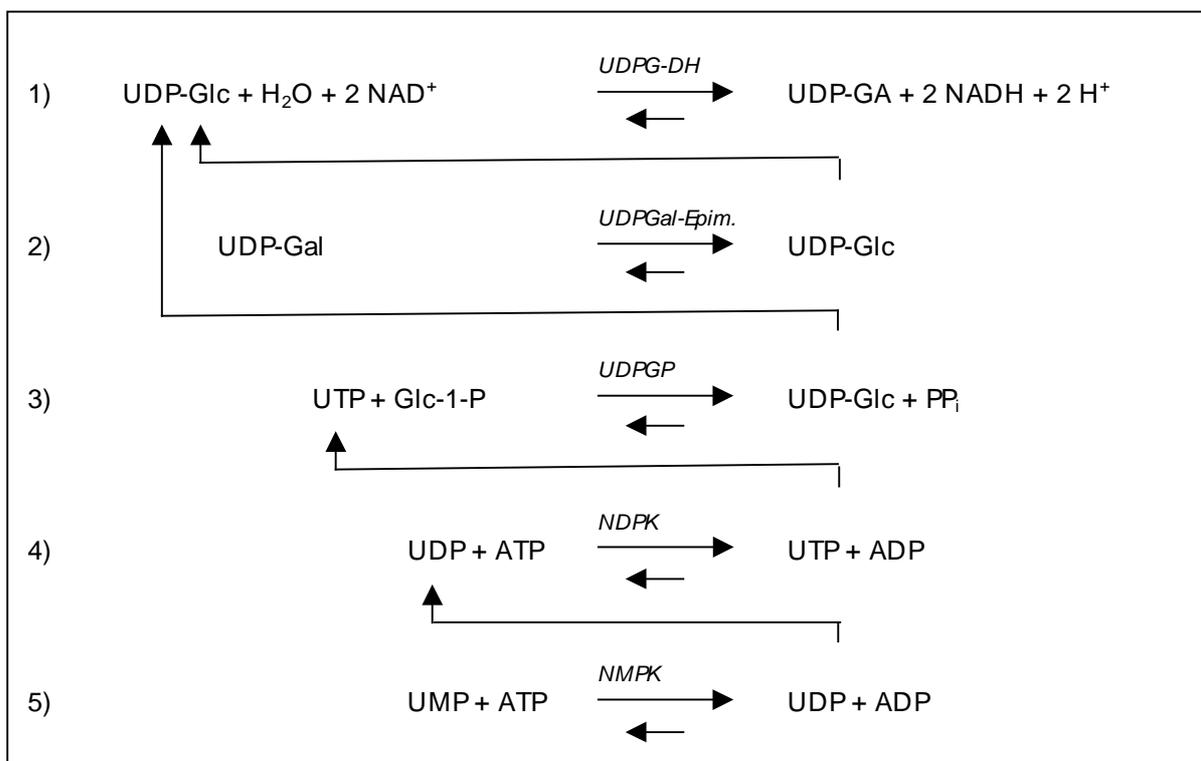


Abb. 8: Reaktionsprinzip der enzymatisch-photometrischen Konzentrationsbestimmung von UDP-Glc, UDP-Gal, UTP, UDP und UMP. Die Konzentrationsbestimmung der o.g. Substanzen in Leberhomogenat erfolgte in einer Halbmikroquarzküvette (Schichtdicke 1 cm) bei 25°C. Die einzelnen Reaktionen waren letztlich an die Reduktion von NAD⁺ zu NADH gekoppelt, dessen Konzentrationszunahme durch Messung der Extinktion bei 340 nm quantifiziert wurde. Die Enzyme wurden in der genannten Reihenfolge eingesetzt. Uridin-5'-diphospho-glucose-Dehydrogenase (UDPG-DH), Uridin-5'-diphospho-galaktose 4'-Epimerase (UDP Gal-Epim.), Uridin-5'-diphospho-glucose-Pyrophosphorylase (UDPGP), Nucleosid-5'-diphosphat-Kinase (NDPK) und Nucleosid-5'-mono-phosphat-Kinase.

Durchführung:

Das bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte neutralisierte Homogenat der verschiedenen Organe wurde aufgetaut, durchmischt und eisgekühlt bis zur Vermessung aufbewahrt. Die Zugabe der verschiedenen Enzyme erfolgte in der unten abgebildeten Reihenfolge (s. Abb. 9), die es ermöglichte, alle Substrate in einem Ansatz nacheinander zu vermessen. Zwischen den einzelnen Messungen der Extinktionen E1-E5 wurde ein Nullabgleich ausgeführt.

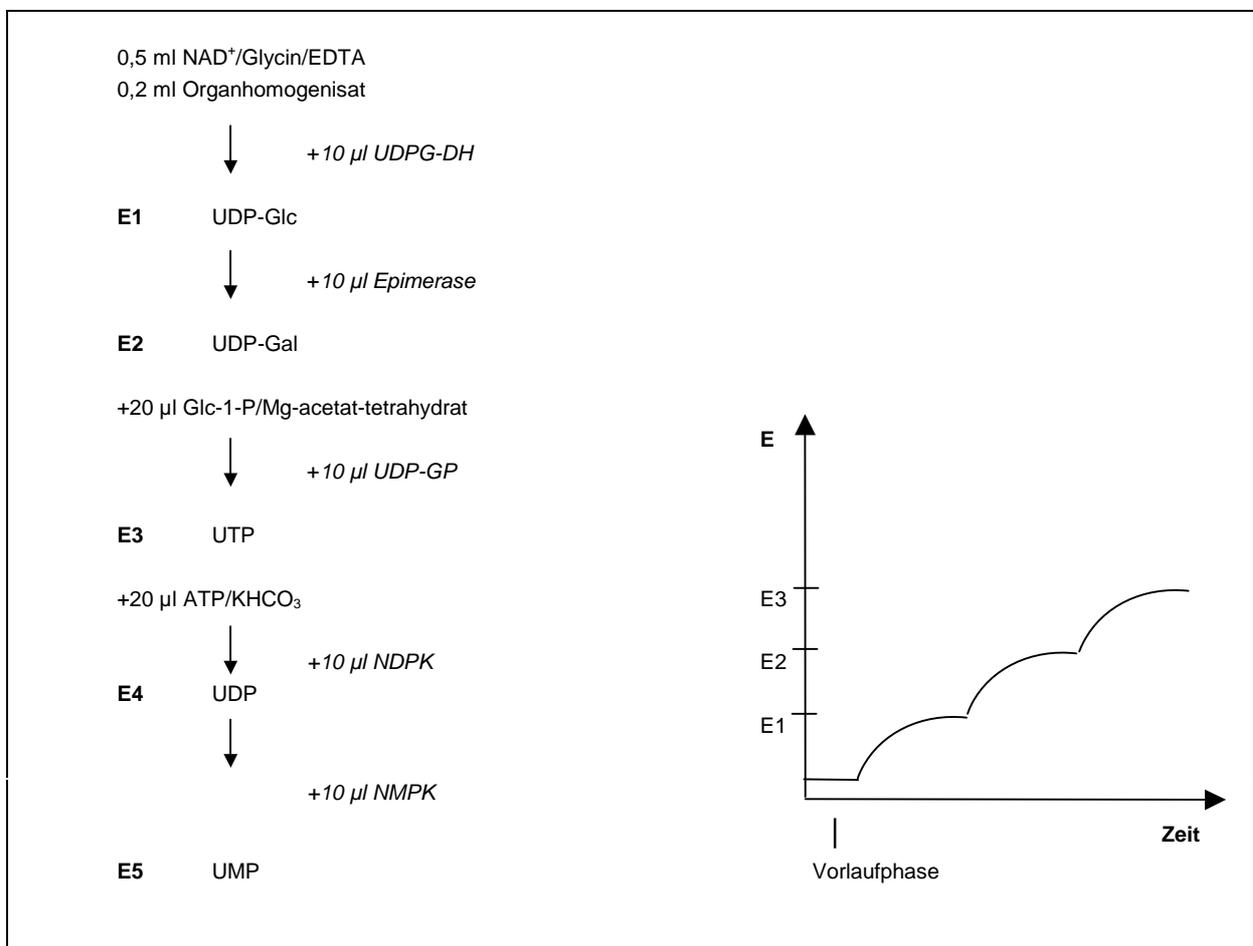


Abb. 9: Schematische Darstellung der Zugabe von Substraten und Enzymen bei der optisch enzymatischen Messung von Uracilnucleotiden und -zuckern und Darstellung des Prinzips der Messung der Extinktionen E1-E5.

4.2.6. Bestimmung von 16 ausgewählten Nucleotiden und Nucleotidzuckern in Organhomogenisaten mittels Anionenaustausch-HPLC (SAX-HPLC)

Die chromatographische Auftrennung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Pels Rijcken et al. (1990) [84].

Aufbau:

Säule: Whatman-Partisphere-Sax (4,6 x 125 mm, Korngröße 5 µm)

Säulentemperatur: 35 °C

Eluent A: 5 mM KH₂PO₄

Eluent B: 500 mM KH₂PO₄

Flussrate: 1 ml/min

Detektion: Uvicon 720-Spektrophotometer (Kontron)

λ ex = 254 nm

Rec scale: 0,1

Zero suppression: -0,001

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% Eluent B
0	2
1(*)	2
5	2
75	7
135	100
150	100
151	2
160	2

(*): Zeitpunkt der Injektion

Durchführung und Auswertung:

Die aus der Enteiweißung und Entfettung hervorgegangenen Proben wurden in einem Probenvolumen von 50 µl über das Aufgabeeventil der HPLC-Anlage injiziert. Es wurde jeweils ein Standardgemisch, gefolgt von drei Proben, vermessen. Die Quantifizierung der Nucleotide erfolgte über das externe Standardgemisch mit definierten Konzentrationen an UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GA, GDP-Man, UTP, UDP, UMP, CTP, CDP, ATP, ADP, GTP und GDP. Anhand der Retentionszeiten konnten die Peaks der Probe den entsprechenden Substanzen des Standardgemisches zugeordnet und deren Fläche quantitativ ausgewertet werden. Die den Proben vor der Entfettung als interner Standard zugeführte GDP-¹⁴C-Fucose diente der Verlustbestimmung an Nucleotiden durch die Probenaufarbeitung. GDP-¹⁴C-Fucose eluierte zwischen der 64. und 80. Minute bei oben dargestelltem Gradienten-Programm. Das die GDP-¹⁴C-Fucose enthaltende Eluat wurde in diesem Zeitraum mit einem automatischen Probensammler in Aliquots von 1,5 ml gesammelt, mit der 4-fachen Menge an Szintillatorflüssigkeit versetzt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler vermessen (cpm). Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der GDP-¹⁴C-Fucose konnte der Verlust durch Delipidierung quantifiziert werden. Der Verlust der anderen Nucleotide sollte sich aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit bei allen Substanzen gleich verhalten.