

**Einsatz verschiedener chromatographischer
Verfahren zur Aufreinigung des
integralen Membranproteins
Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-
Acyltransferase [EC 2.3.1.23]**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Kai Habben
geboren am 11. August 1969 in Wittmund

Referent: PD Dr. Walter Müller

Koreferent: Prof. Dr. Volkhard Kaever

Tag der Promotion: 16.07.1999

Diese Dissertation wurde aus Mitteln des Yamanouchi Research Institutes,
Oxford, UK gefördert.

**Meinen Freunden, die eine wichtige Bereicherung meiner
Freizeit darstellen, gewidmet.**

ABKÜRZUNGEN	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 FUNKTION UND STRUKTUR VON BIOMEMBRANEN.....	1
1.2 PHOSPHOLIPID-NEUSYNTHESE UND LANDS-ZYKLUS.....	1
1.3. DIE FAMILIE DER LYSOPHOSPHOLIPID:ACYL-CoA-O-ACYLTRANSFERASEN	3
1.3.1 VORKOMMEN UND SUBSTRATSPEZIFITÄTEN DER LPLAT.....	3
1.3.2 Strategien zur Aufreinigung von LPLATs	4
1.3.3 Bedeutung der Fettsäure-Remodellierung in der Zellproliferation	5
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	6
2. MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1 MATERIAL.....	8
2.1.1 Chemikalien	8
2.1.2 Geräte	10
2.1.3 Verbrauchsmaterial	11
2.2 ZELLULÄRE METHODEN.....	13
2.2.1 T-Zellpräparation (E ⁺).....	13
2.2.2 Zellzählung.....	14
2.2.3 Linolsäureeinbau	14
2.3 VERWENDUNG DER 18-AMINO-ÖLSÄURE.....	15
2.3.1 Iodierung des Photoaffinitätsmarkers.....	15
2.3.2 Photolyse des iodierten ASO-CoA	16
2.4 SYNTHESE VON ARACHIDONOYL-CoA.....	16
2.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	17
2.5.1 Bestimmung der LAT-Aktivität.....	17
2.5.1.1 Radioaktive LAT-Enzymaktivitätsbestimmung (LAT-Standard-Assay)	17
2.5.1.1.1 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide:	18
2.5.1.2 DTNB-Assay.....	18
2.5.1.3 Fluorimetrischer Assay	19
2.5.2 Proteinbestimmung (BCA-Test).....	20
2.5.3 Präparation aktiver Enzymfraktionen.....	20
2.5.3.1 Darstellung von Zellmembranen aus Plazenta	21
2.5.3.2 Präparation der integralen (iLAT) und peripheren LAT (pLAT) aus Zellmembranen	22
2.5.3.3 Präparation des OGP/NaCl-Überstandes (ÜS _{2 dia}).....	23
2.5.4 Komplexzerlegung und Rekonstitution.....	24
2.5.4.1 Rekonstitution.....	25
2.5.5 Chromatographische Separation	27
2.5.5.1 Gelfiltration.....	27

2.5.5.2 Anionenaustauscher	28
2.5.5.3 Hydrophobizitätschromatographie	28
2.5.5.4 Hydroxylapatit	29
2.5.5.5 Affinitätschromatographie	30
2.5.5.5.1 18-Amino-Ölsäure als Ligand in der Affinitätschromatographie.....	30
2.5.5.5.2 Kopplung von N-Palmitoyloxysuccinimid an EAH-Sepharose	32
2.5.5.5.3 Palmitoyl-CoA-Agarose	33
2.5.5.5.4 Phase-Transition Chromatographie mit Transil®	33
2.5.6 <i>Aufreinigungsstrategie</i>	35
2.5.7 <i>Gelelektrophorese</i>	35
2.5.7.1 SDS-Gele	35
2.5.7.1.1 Laemmli SDS-Gel.....	36
2.5.7.1.2 Schägger und Jagow-System	37
2.5.7.1.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF und 2D).....	38
2.5.7.2 Native PAGE	40
2.5.8 <i>Färbung und Trocknung der Gele</i>	41
2.5.8.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie oder GelCode®	41
2.5.8.2 Silberfärbung	42
2.5.8.3 Trocknung der Gele	42
2.5.9 <i>Western-Blotting</i>	43
2.5.9.1 Semi-Dry-Blotting	43
2.5.9.2 Naßblotting	44
2.5.9.3 Färbung der Membran.....	45
2.6 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	45
2.6.1 <i>ECL-Reaktion</i>	46
2.6.1.1 Wiederverwendung von Blotmembranen.....	47
2.6.2 <i>Immunpräzipitation</i>	47
2.7 MIKROSEQUENZIERUNG	48
2.7.1 <i>Proteolytischer Verdau und Trennung der Fragmente</i>	48
2.7.2 <i>Sequenzbestimmung über einen Sequenzer</i>	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1 ZELLULÄRE BEDEUTUNG DER LAT	51
3.1.1 <i>Einbau von Linolsäure</i>	51
3.1.2 <i>Messung der LAT-Aktivität in Homogenaten</i>	52
3.2 BIOCHEMISCHE SCHRITTE ZUR AUFREINIGUNG DER LAT	52
3.2.1 <i>Vorfractionierung der enzymatischen Aktivität</i>	52
3.2.1.1 LAT-Aktivität in Erythrozyten-Membranen	55
3.2.2 <i>Komplextrennung durch Einsatz verschiedener Detergentien</i>	56
3.2.2.1 <i>Aufspaltung eines möglichen pLAT-Komplexes</i>	56

3.2.2.2 Spaltung des aktiven OGP/NaCl-Komplexes.....	57
3.2.2.2.1 Detergensabhängigkeit der LAT-Aktivität des OGP/NaCl-Überstandes	58
3.2.2.2.2 Rekonstitution der LAT-Aktivität.....	60
3.2.3 <i>Chromatographische Verfahren</i>	62
3.2.3.1 Trennung nach Molekulargewicht durch Gelfiltration	62
3.2.3.1.1 Gelfiltration der pLAT nach CHAPS-Behandlung	63
3.2.3.1.2 Gelfiltration mit dem aktiven OGP/NaCl-Komplex.....	64
3.2.3.2 Hydrophobizitätschromatographie	68
3.2.3.3 Anionentauscher	71
3.2.3.4 Anreicherung von LAT-Aktivität durch Hydroxylapatit.....	72
3.2.3.5 Phase-Transition-Chromatographie mit Transil®	75
3.2.3.5.1 Elution unter Temperaturveränderung	75
3.2.3.5.2 Elution mittels NaCl-Gradient	76
3.2.3.6 Affinitätschromatographische Ansätze	77
3.2.3.6.1 Palmitinsäure-Sepharose.....	77
3.2.3.6.2 Palmitoyl-CoA-Agarose	83
3.2.3.6.3 Kopplung von 18-Amino-Ölsäure an aktivierte CH-Sepharose 4B	86
3.2.3.6.4 Kopplung von 18-Amino-Ölsäure an NHS-aktivierte Sepharose	89
3.2.3.7 Kombination von Säulen.....	96
3.2.4 <i>Native Page zur Auftrennung von Detergens-behandelten Protein-Komplexen</i>	99
3.2.5 <i>Auftrennung von Proteinfractionen über 2D-Elektrophorese</i>	102
3.3 IMMUNOLOGISCHE VERFAHREN	106
3.3.1 <i>Western Blot/ECL-Detektion</i>	106
3.3.2 <i>Immunpräzipitation</i>	107
3.4 MIKROSEQUENZIERUNG	107
3.4.1 <i>Identifizierung der 160 kDa-Proteinbande</i>	108
3.4.2 <i>Identifizierung der 57, 60 und 66 kDa Proteinbanden</i>	108
4. DISKUSSION	109
5. ZUSAMMENFASSUNG	126
6. REFERENZEN	127
7. ANHANG	138

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACBP	Acyl-CoA-bindendes Protein
A-CoA	Arachidonoyl-Coenzym A
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASO-CoA	18-(4'-Azido-2'-hydroxybenzoylamino)-oleoyl-CoA
ATCC	American Tissue Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Crosslinker-Gehalt (= Anteil an Bisacrylamid)
ca.	zirka
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylamino)-1-propansulfonat
CM	Ausgangsmembranen (engl. crude membranes, CM)
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)
CMC	Kritische Mizellenbildungskonzentration (<i>critical micellar concentration</i>)
CoA	Coenzym A
cpm	Zählereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatogramm
DHP	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethyl-Ether)
EL	Erythrozytenlipide
E ⁺	reine T-Zellen nach Rosettierung mit Schafserythrozyten
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FACS	Durchflußzytometrie (<i>Fluorescence activated cell scanning</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FPLC	Schnellauflösende Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
GPAT	Glycerinphosphat Acyltransferase
Hac	Essigsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (<i>high performance thin layer chromatography</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP)
HSA	Humanes Serumalbumin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
iLAT	integrale LAT
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LAT	Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase

LPAAT	Lysophosphatidsäure:Acyl-CoA-O-Acyltransferase
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipid
LPLAT	Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferase
M	Molar (mol/l)
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight
MeOH	Methanol
Min	Minuten
MW	Molekulargewicht (engl.:molecular weight)
NAM	N-(9-Acridinyl)maleinimid
OGP	Octylglucopyranosid
P	Pellet
p.a	Analysenqualität (pro analysis)
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (engl.: peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.:phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PE	Phosphatidylethanolamin
PHA	Phorbolester
pI	Isoelektrischer Punkt
PITC	Phenylisothiocyanat
PLA ₂ / PLC/ PLD	Phospholipase A ₂ / C / D
pLAT	periphere LAT
PS	Phosphatidylserin
PTH	Phenylthiohydantoin
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl.: polyunsaturated fatty acids)
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RPMI	Roswell-Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Sulfhydryl-Gruppe
SPM	Sphingomyelin
T	Gesamtgehalt (an Acrylamid)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: weight/volume)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

SI-Einheiten, chemischen Elementsymbole sowie die Abkürzungen für biogene Aminosäuren sind nicht als Abkürzungen aufgeführt.

1. Einleitung

1.1 Funktion und Struktur von Biomembranen

Biologische Membranen stellen eine Barriere zwischen dem extrazellulären Raum und dem Cytoplasma von Zellen (Plasma-Membran) oder aber zwischen dem Cytoplasma und internen Kompartimenten, den Zellorganellen, dar. Die Membran ist dabei auf der einen Seite eine Abgrenzung gegen hydrophile Lösungen; auf der anderen Seite sind in der Membran Proteine enthalten, die einen Austausch von Informationen zwischen den einzelnen Kompartimenten ermöglichen. Durch spezifische Ionenpumpen, Rezeptoren, Kanäle oder Enzyme können biochemische Prozesse gesteuert werden.

Membranen bestehen aus einem heterogenen Gemisch von Lipiden, Proteinen und mit diesen verknüpften Kohlenhydraten. Das Protein:Lipid-Verhältnis ist sehr variabel in Abhängigkeit von der Funktion der Membran. Der Proteinanteil liegt aber in der Regel über 50 %. Die Lipidbestandteile setzen sich ebenfalls abhängig von der Membranfunktion zusammen. Neben Glykolipiden und Cholesterin sind Phospholipide am häufigsten vertreten (*Zachowski et al., 1993*). Der amphotere Charakter der Phospholipide führt zu einer asymmetrischen Doppelschichtbildung. *Singer und Nicolson (1972)* postulierten das „Fluid-Mosaic-Modell“, nach dem eine Membran, entsprechend ihrer Lipidkomponenten, einen bestimmten Fluiditätszustand besitzt und Proteine lateral in der Membran diffundieren können. Die Membranfluidität wird zu einem Teil durch Cholesterin reguliert. Sie steigt aber auch proportional mit dem Gehalt ungesättigter Fettsäuren in den Phospholipiden. Die Struktur der Doppelmembranen hat daher eine bedeutende Funktion bei der Regulation membranabhängiger Prozesse (*Momchilova et al., 1991*).

1.2 Phospholipid-Neusynthese und Lands-Zyklus

Die *de novo* Phospholipidsynthese findet in der Zelle am endoplasmatischen Retikulum statt. Phosphatidylcholin (PC) stellt den größten Phospholipidanteil der Membranen von Säugergewebe (*White et al., 1973*) bzw. der eukaryontischen Zelle (*Deuel, 1951*) dar.

Diacylglycerophospholipide wie das PC werden speziell im Cytidindiphosphat-Cholin-Weg generiert (*Vance und Choy, 1977*). Glycerin-3-phosphat wird dabei in mehreren Schritten zum 1,2-Diacylglycerinphosphat acyliert. Durch eine Dephosphorylierung entsteht das 1,2-Diacylglycerin (1,2-DAG). Dieses kann zu Triglyceriden acyliert oder mittels der Ethanolamin-Phosphotransferase zu Phosphatidylethanolamin oder der Cholin-Phosphotransferase zu Phosphatidylcholin umgesetzt werden (*Vance et al., 1985*). Die beiden letztgenannten beiden Enzyme zeigen eine geringe Substratspezifität für die Fettsäuren des

1,2-Diacylglycerinmoleküls (1,2-DAG) und die Phospholipide weisen daher zunächst eine zufällige Fettsäurezusammensetzung auf (*Lands et al., 1965*).

Andererseits ist die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide aber streng reguliert. In den 1,2-Diacylphospholipiden enthält die C1-Position in der Regel gesättigte Fettsäuren, während die C2-Position häufig ungesättigte Fettsäuren beinhaltet. Die Synthese von Phospholipiden mit definierterem Fettsäuregehalt kann durch sogenannte Fettsäure-Remodelierung über CoA-abhängige (*Trotter et al., 1982*) oder CoenzymA-unabhängige (*Kramer et al., 1983*) Transacylierungsreaktionen und - speziell für ungesättigte Fettsäuren - über den Lands-Zyklus (*Lands et al., 1982*) erfolgen.

Im Lands-Zyklus wird die Fettsäure der sn-2-Position durch eine Phospholipase A₂ abgespalten (*Mukherjee et al., 1994*) und es entsteht neben der freien Fettsäure ein Lysophospholipid. Die Enzymfamilie der Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferasen kann als einzige aktivierte Fettsäuren in Phospholipide einbauen. Das im Lands-Zyklus entstandene Lysophospholipid wird durch diese Enzymklasse sofort acyliert. Die Abbildung 1.1.1 zeigt diesen Deacylierungs-Reacylierungs-Zyklus für die Phospholipidkomponente Phosphatidylcholin.

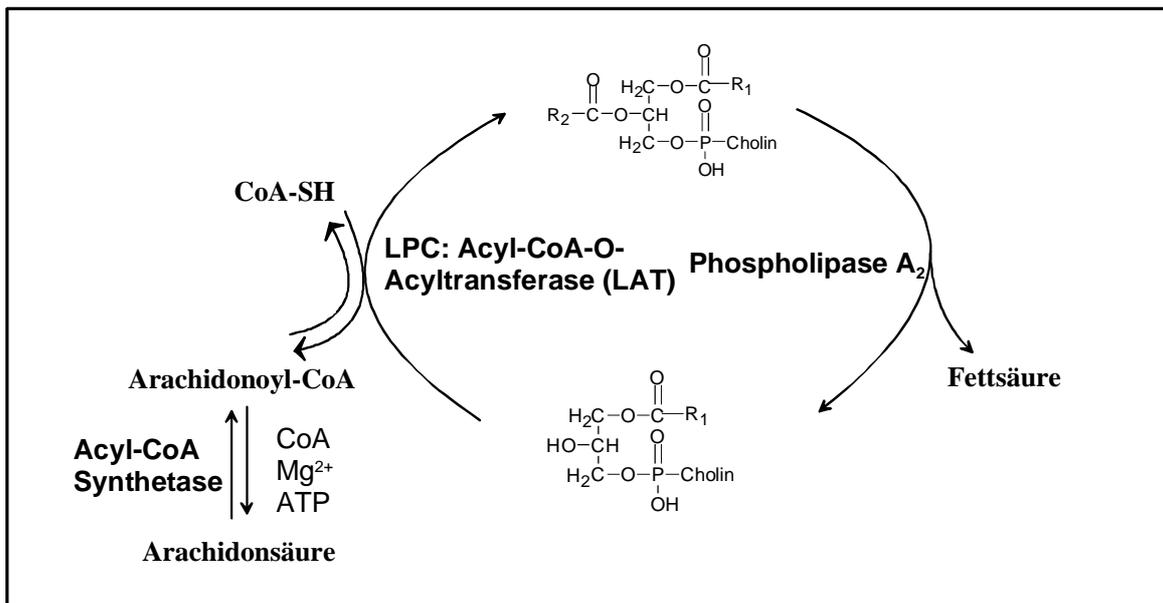


Abb. 1.1.1: Reacylierungs-Deacylierungs-Zyklus

Die Fettsäurezusammensetzung kann auf diese Weise schnell verändert und kontrolliert werden. So haben die Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferasen u. a. eine bedeutende Rolle in der Regulation des freien Arachidonsäurespiegels (*Fuse et al., 1989*). Arachidonsäure ist ein Vorläufer von Eicosanoiden wie Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen (*Flesch et al., 1989*) und kommt in Entzündungszellen (wie Monozyten/Makrophagen oder Neutrophilen Granulozyten) nur in geringen Mengen als freie Säure vor (*Chilton et al., 1996*). Der größte Teil wird im Lands-Zyklus nach Aktivierung durch die Acyl-CoA-Synthetase in

Phospholipide eingebaut (*Irvine et al., 1982*) und so gespeichert. Die Arachidonsäure kann bei Bedarf durch die Phospholipase A₂ aus den Phospholipiden abgespalten und zur Eicosanoidsynthese verwendet werden.

Außer der Regulation des Arachidonsäure-Spiegels haben diese Acyltransferasen, neben den Phospholipasen (PLA₂, PLC, PLD und Sphingomyelinasen), Transacylasen etc., die bedeutende Aufgabe, Speicher für weitere Lipidmediatorvorläufermoleküle zu synthetisieren. Abgesehen von den Eicosanoiden stellen Diacylglyceride, PAF und Ceramide bioaktive Lipide dar. Des Weiteren kommen LPC und vor allem LPA und PA als mögliche *second messenger* in Frage, die darüber hinaus in einem Cytokin-Netzwerk reguliert werden können (*Serhan et al., 1996*).

1.3. Die Familie der Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferasen

Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferasen (LPLAT) sind in verschiedenen Zellen und Geweben weit verbreitet.

1.3.1 Vorkommen und Substratspezifitäten der LPLAT

Lysophospholipid:Acyl-CoA-O-Acyltransferaseaktivität (LPLAT) wurde zum ersten Mal in Rattenleber-Mikrosomen von *Lands et al. (1960)* beschrieben. Es sollte sich herausstellen, daß dieses Enzym Mitglied einer ubiquitär vorkommenden und vor allem vielfältigen Enzymklasse ist. Entsprechende Aktivitäten wurden in Säuger-Gewebe (*Choy et al., 1989 und Choy et al., 1992*), Bakterien (*Proulx und van Deenen, 1966*), Vertebraten (*Holub et al., 1976*), Pflanzen (*Devor und Mudd, 1971*), Protozoen (*Okuyama et al., 1977*), sowie Insekten (*Heckman et al., 1977*) und Pilzen (*Das und Banerjee, 1977*) nachgewiesen.

Die Anzahl und die Eigenschaften der Acyltransferasen sind nur lückenhaft untersucht. Zur näheren Charakterisierung der Acyltransferase-Familie wurden schon 1964 Experimente von Lands und Hart hinsichtlich der Substratabhängigkeit durchgeführt, mit der Erkenntnis, daß sich die Acyltransferasen in ihrer Spezifität für LPL und Acyl-CoAs unterscheiden. Es wurden Acyltransferasen gefunden, die bevorzugt 2-Acylglycerophosphocholin oder 1-Acylglycerophosphocholin als Substrat umsetzen. Dabei werden gesättigte Fettsäuren bevorzugt in sn1-Position und ungesättigte bevorzugt in sn2-Position eingebaut.

Eine gewebeabhängige Verteilung von spezifischen Acyltransferasen zeigte sich als sehr wahrscheinlich, da z. B. die Aufreinigung identischer Enzymaktivitäten aus verschiedenen Geweben zu signifikanten Unterschieden führte (*Sanjanwala et al., 1988*). *MacDonald und Sprecher (1989)* zeigten, daß in menschlichen Neutrophilen Granulozyten bevorzugt Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylethanolamin als Acyl-CoA-Akzeptor dienen. In Rattenleber wird beispielsweise 1-Palmitoyl-Lysophosphatidylcholin gegenüber 1-Stearyl-Lysophosphatidylcholin als Acyl-CoA-Akzeptor bevorzugt (*Holub et al., 1979*). Die Spezifität hinsichtlich der Acyl-CoA-Donatoren ist ebenfalls vielfältig. In Rattenleber wurde eine hohe Affinität der Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase für ungesättigte Fettsäuren, speziell Arachidonoyl-CoA nachgewiesen (*Lands et al., 1982; Iritani et al.,*

1984). In Lungen-Mikrosomen bevorzugt die Acyltransferase Palmitoyl-CoA gegenüber Oleoyl-CoA (*Sanford und Frosolono, 1983* sowie *Batenburg et al., 1979* und *Arche et al., 1987*). In der Lunge dienen 1,2-Dipalmitoylglycerine aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften als Surfactant zur Stabilisierung der Alveolen (*Van Heusden et al., 1980*).

Die Vielfalt der Substratspezifitäten wird möglicherweise potenziert durch den Einfluß der Fettsäuren in der Position 1 oder 2 des Lysophospholipids. Während z. B. 1-Palmitoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin ein ausgezeichnetes Substrat darstellt (*Baker et al., 1981*) sind 1-Decanoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin und 1-Myristoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin ausgesprochen ungeeignete Substrate (*van den Bosch et al., 1967*). Eine umfangreiche (und daher hier nicht dargestellte) Übersicht vermittelt die ExPasy-Datenbank „BRENDA“ (EC-Nummer: 2.3.1.23). Während der Enzymaufreinigung konnte besonders durch den Einsatz von Detergentien eine Veränderung von Substratspezifitäten ermittelt werden (*Dekka et al., 1986* und *Sanjanwala et al., 1988*). Acyltransferasen scheinen daher sehr von ihrer Lipidumgebung abhängig zu sein.

Desweiteren konnte eine unterschiedliche Lokalisation der Acyltransferaseaktivität in der Zelle nachgewiesen werden, wie z. B. in Mikrosomen (*Eibl et al., 1969*), in Mitochondrien und Plasmamembranen (*Colard et al., 1980*; *Arthur und Page, 1987*) und mit geringer Aktivität in cytosolischen Fraktionen aus Kaninchenherz (*Needleman et al., 1985*). Untersuchungen von *Renooij und Snyder (1981)* weisen bei der mikrosomalen Aktivität auf eine transmembrane Lokalisation der Acyltransferasen hin.

1.3.2 Strategien zur Aufreinigung von LPLATs

Die molekulare Struktur der Lysophospholipid-Acyltransferasen ist aufgrund der schwierigen Reinigung und Solubilisierung aus mikrosomalen Membranen nur oberflächlich charakterisiert. Die Aufreinigung einer Lysophosphatidylcholin-spezifischen Acyltransferase führte im ersten Schritt in der Regel zum Einsatz von Detergentien zur Solubilisierung der Aktivität aus den Mikrosomen. Verschiedene Detergentien wie Triton X-100 (*Yamashita et al., 1975 und 1981*), das zwitterionische CHAPS (*Sanjanwala et al., 1988*), Desoxycholat (*Deka et al., 1986*) oder aber Natrium-Cholat (*Mukherjee et al., 1992*) konnten dabei jedoch nur eine partielle Solubilisierung erreichen. Der Detergenseinsatz führte in höheren Konzentrationen häufig zum vollständigen Aktivitätsverlust. Eine Alternative zu künstlichen Detergentien stellte die detergente Wirkung von natürlichen Substraten oder aber Detergentien mit Substratähnlichkeit dar (*Tanford und Reynolds 1976, Weltzien et al., 1979 und Zahler et al 1968*). Die Verwendung von LPC und Oleoyl-CoA führte zur erfolgreichen Solubilisierung einer Acyltransferase-Aktivität aus Rattenleber (*Gavino und Deamer 1982 und 1983*). Die Vesikelbildung aus natürlichen Substraten wurde auch von *Fyrst et al., (1996)* zur Reinigung einer Acyl-CoA:1-Acyllysophosphatidylcholin-O-Acyltransferase ausgenutzt. In Verbindung mit dieser Technik wurden Dichtegradienten zur Vesikeltrennung eingesetzt.

Konventionelle Säulenchromatographie (Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie) wurde vielfach eingesetzt, um solubilisiertes Enzymmaterial zur Homogenität aufzureinigen (*Sanjanwala et al., 1989*), führte aber meist zu einer weiteren Inaktivierung der Enzymaktivität. Mit Hilfe der Gelfiltration konnten in einigen Fällen eine Aktivität abgetrennt und eine Molekulargewichtsangabe gemacht werden. Die ermittelten Molekulargewichte der LPC-spezifischen Acyltransferasen betragen dabei 21 kDa (*Fyrst et al., 1996*), 43 kDa (*Deka et al., 1986*), 64 kDa (*Sanjanwala et al., 1988*), 110 kDa (*Rajasekharan et al., 1993*) und 225 kDa (*Hasegawa-Sasaki et al., 1980*). Darüber hinaus zeigten Experimente mit einem Photolabel von *Gehring et al. (1998)*, daß möglicherweise große Enzymkomplexe (> 300 kDa) vorliegen.

Spezifischere Möglichkeiten der Acyltransferaseaufreinigung versprachen die Entwicklung photoreaktiver Substrate (*Rajasekharan et al., 1994*). Die Erkennung der photoreaktiven Substratanaloga durch die Acyltransferase aus Sojabohnen sollte deren Identifizierung erleichtern und dadurch die Aufreinigung dieses Membranproteins ermöglichen. 18-Amino-Ölsäure wurde in unserer Arbeitsgruppe in vergleichbarer Form als Photoaffinitätsmarker synthetisiert und zur Identifizierung der LPC-spezifischen Acyltransferase aus humaner Plazenta eingesetzt (*Gehring et al., 1998*).

Allen Bemühungen zum Trotz konnte eine LPC-spezifische Acyl-CoA-O-Acyltransferase bis heute nicht vollständig biochemisch gereinigt und sequenziert werden.

1.3.3 Bedeutung der Fettsäure-Remodellierung in der Zellproliferation

Die ca. hundert verschiedenen Phospholipidspezies im Gewebe und in den Zellen von Säugern resultieren aus der Umverteilung von Fettsäuren in dem unter Kapitel 1.2 beschriebenen Remodellierungsapparat, der von Acyltransferasen, Transacylasen, Phospholipasen etc. gebildet wird. Die Aufgabe dieser komplexen Maschinerie besteht außerdem in der Synthese und Degradation bioaktiver Lipide und ihrer Vorläufermoleküle (*Yamashita et al., 1997*) sowie der Reparatur von Membranschäden. Eine wesentliche Rolle wird dem Remodellierungsprozeß während der frühen Phase der T-Zellaktivierung eingeräumt (*Kerkhoff et al., 1997*).

Die Aktivität der LPC-spezifischen Acyltransferase, welche ebenfalls ungesättigte, aktivierte Fettsäuren wie Arachidonsäure bevorzugt, wird in unterschiedlichen pathophysiologischen Zuständen als verändert beschrieben. Hierzu gehört u. a. eine 50-70 %ige Erhöhung der Lysophospholipid-Acyltransferase in Hirngewebe von Alzheimer-Patienten. Zur gleichen Zeit ist die Phospholipase A₂ im gleichen Gewebeareal um 35-53 % erniedrigt und die Enzyme der *de novo* Phospholipidsynthese zeigen ein normales Aktivitätsmuster (*Ross et al., 1998*).

Auch in Untersuchungen an Erythrozyten konnte ein veränderter Phospholipid-Metabolismus nachgewiesen werden. In der als „spur cell anemia“ beschriebenen hämolytischen Anämie wurde ein stark verändertes Phospholipid-Verhältnis in Erythrozytenmembranen zu Gunsten von Cholesterol gegenüber Phospholipiden festgestellt. Dabei wurde besonders der Einbau

von Arachidonsäure inhibiert. Diese Inhibition konnte *in vitro* durch Cholesterol induziert werden. Im Vergleich dazu führte der LAT-Inhibitor Thimerosal zu einer der „spur cell anemia“ ähnlichen Erscheinung an Erythrozyten (Allen *et al.*, 1996). Eine mögliche Funktion der LAT zur Reparatur von Membranschädigungen wird hier diskutiert.

Eine Reihe von Daten aus Tiermodellen suggerieren einen Einfluß von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf das Wachstum von Tumoren. Dabei zeigten sich gegensätzliche Ergebnisse für Fettsäuren der n-6 und der n-3 Reihe. Linolsäure (18:2, n-6) führte in Diätstudien zu einem verstärkten Wachstum von Brustadenokarzinomen bei Mäusen (Abraham *et al.*, 1983). Eine Diät mit einem an Eicopentaensäure (EPA, n-3) und Dodecahexansäure (DHA) reichen Fischöl konnten das Wachstum transplantierte Tumore inhibieren (Borgeson *et al.*, 1989, Tisdale *et al.*, 1991 und Sakaguchi *et al.*, 1990). Unterstützende Ergebnisse wurden in Diätexperimenten mit MDA-MB-435-Zellen, einer humanen Brustzelltumorzelllinie, im Mausmodell erbracht. Zusätzlich wurde hier durch Linolsäure auch der Metastasierungsprozeß gefördert (Rose *et al.*, 1993). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Tumorwachstum und der verstärkten Phospholipid Fettsäure-Remodellierung konnte in humanem und Ratten-Prostata Adenokarzinomgewebe gezeigt werden (Fass *et al.*, 1996). Im Vergleich zwischen gutartigem und malignem Gewebe wurde die Aktivität der Phospholipase A₂, Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase, Fettsäure Desaturase, Fettsäure Acyl-CoA-Hydrolase und -Synthetase untersucht. Die Phospholipase A₂ zeigte eine zweifache und die Acyltransferase eine 4-12 fache Erhöhung ihrer normalen Aktivität, während alle anderen Enzyme keine Veränderung aufwiesen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß viele autonom proliferierende Zelllinien eine erhöhte Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase (LAT) wird eine bedeutende Rolle in der Regulation der Fettsäureverteilung in Membranlipiden, in der T-Zellaktivierung und in der Kontrolle der intrazellulären Arachidonsäure-Konzentration zugeschrieben. In verschiedenen pathophysiologischen Zuständen ist die Enzymaktivität signifikant erhöht. Es soll daher der Aktivitätszustand der LAT in T-Zell-Tumorlinien im Vergleich zu normalen T-Zellen ermittelt werden.

Bis heute ist es weder gelungen, dieses Enzym klassisch biochemisch aufzureinigen, noch haben Homologieklonierungen über die Acyltransferase-Familie zur Isolierung der LAT geführt. Um langfristig pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten zu ermöglichen, ist es unerlässlich, die Lysophosphatidylcholin:Acyl-CoA-O-Acyltransferase aufzureinigen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, eine Strategie zur Aufreinigung dieses membranständigen Enzyms zu entwickeln und Sequenzdaten zu erhalten.

Aus humaner Plazenta konnte mittels Hochsalzbehandlung neben der microsomalen eine lösliche LAT-Aktivität stabil abgetrennt werden. Chromatographische Analysemethoden führten dabei zu keiner homogenen Aufreinigung der LAT.

Durch den Einsatz von Detergentien kann daher versucht werden, aus der mikrosomalen Fraktion die integrale LAT zu solubilisieren und dabei einen wahrscheinlichen Lipid-Protein-Komplex zu spalten. Die Analyse soll zunächst mittels konventioneller Chromatographie erfolgen. Des Weiteren sollen Affinitätsmatrizen entwickelt und die selektive Abtrennung der LAT auf diesem Wege verbessert werden. Kandidatenproteine sollen in Verbindung mit einem Photoaffinitätsmarker identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol, Sigma, Deisenhofen
Acetonitril, Merck, Darmstadt
Acrylamid, FlukaBiochemika, Neu-Ulm
Anti-Kaninchen IgG, Sigma, St. Louis, USA
Ammoniumperoxodisulfat, Sigma, Deisenhofen
Arachidonoylchlorid, NuChekPrep, Elysian, USA
Bestatin, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Bicinchoninsäure (BCA), Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid, FlukaBiochemika, Neu-Ulm
Borsäure, Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen
CHAPS, Sigma, Deisenhofen
Chloramin-T, Sigma, Deisenhofen
Cholesterin (Ch), Sigma, Deisenhofen
CH-Sepharose 4B, Pharmacia, Freiburg
Coenzym A, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Coomassie-Brillant Blue-G, Sigma, Deisenhofen
Coomassie-Brillant Blue-R, Sigma, Deisenhofen
CuSO₄ x 5 H₂O (4%; v/v), Sigma, Deisenhofen
α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma, Deisenhofen
DHP, Sigma, Deisenhofen
Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (PE), Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol, Calbiochem, Bad Soden
DTNB, Sigma, Deisenhofen
E-64, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
EAH-Sepharose, Pharmacia, Freiburg
ECL-Fertiglösungen, Amersham LifeScience, Amersham, UK
EDTA, Merck, Darmstadt
Ficoll-Lösung, Seromed, Berlin
Formaldehyd, Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS), PAA Biologics, Marburg
GelCode[®]-Fertiglösung, Pierce, USA

Gelfiltration-Equilibationsmarker, Pharmacia, Freiburg
Geltrocknungslösung, Anamed, Offenbach
Glycin, Serva, Heidelberg
Harnstoff, Sigma, Deisenhofen
Hydroxylapatit keramisch, Biorad, München
IPG-Puffer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPG-Steifen, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Leupeptin, Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin, 200 mM (100x), GIBCO/BRL, Eggenstein
¹⁴C-Linolsäure, NEN, Boston, USA
Linolsäure, Sigma, Deisenhofen
Lys-C, Boehringer-Mannheim, Mannheim
Lysophosphatidylcholin (¹⁴C); American Radiolabeled Chemicals, USA
Lysophosphatidylcholin (LPC), Sigma, Deisenhofen
Molekulargewichtsmarker vorgefärbt, Biorad, München
Na-[¹²⁵J], ICN Biomedicals, Meckenheim
Na-Cholat, Serva, Heidelberg
NAM, Sigma, Deisehofen
NHS-aktivierte Sepharose (HiTrap-Fertigsäulen), Pharmacia, Freiburg
N-Palmitoyloxysuccinimid, Sigma, Deisenhofen
OGP, Calbiochem, LaJolla, USA
Palmitoyl-CoA-Agarose, Sigma, Deisenhofen
PBS Instamed L182-10, Trockensubstanz ohne Mg²⁺ und Ca²⁺, Seromed, Berlin
Pefabloc, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Penicillin/ Streptomycin in physiologischer Kochsalzlösung, GIBCO/BRL, Eggenstein
Pepstatin, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Phosphatidylcholin (PC), Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylethanolamin (PE), Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylserin (PS), Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrolidon (PVP), Sigma, Deisenhofen
Protein A, Sigma, St.Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA),Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (fettsäurefrei),Sigma, Deisenhofen
Roti-Blue (5x), Roth, Karlsruhe
RPMI1640 mit L-Gln, GIBCO/BRL, Eggenstein
Schafserythrozyten (Neuraminidase behandelt) Transfusionsmedizin
SDS, Calbiochem, Bad Soden
Silbernitrat, Merck, Darmstadt
Sphingomyelin (SPM), Sigma, Deisenhofen

Szintillationscocktail Emulsifier Safe, Canberra Packard, Frankfurt
TEMED, Serva, Heidelberg
TFA, Sigma, Deisenhofen
Thioharnstoff, Sigma, Deisenhofen
Transil[®]-Material, Nimbus, Leipzig
Tricin, Sigma, Deisenhofen
Triton X-100 reduziert, Sigma, Deisenhofen
Trypanblau, Serva, Heidelberg
Trypsin, Promega, Heidelberg
Tween, Sigma, St. Louis, USA
Ziegenserum, Sigma, St. Louis, USA
Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat, Sigma, St. Louis, USA

Sonstige Laborchemikalien (Salze und Lösungsmittel) wurden über das Chemikalienlager der Medizinischen Hochschule Hannover entsprechend der Angebotssituation in Analysenqualität bezogen.

2.1.2 Geräte

Brutschrank B5060K/CO₂, Heraeus-Christ GmbH, Hanau
DC-Färbekammer, Desaga, Heidelberg
Dünnschichtchromatographiekammern (Glas, horizontal), Desaga, Heidelberg
EIA-Reader MR 5000, Dynatech, Denkendorf
FACScan, Becton-Dickinson Inc., Heidelberg
FACScan Auswerte-Einheit HP 9000 340, Hewlett Packart, Amstelveen, NL
Feinwaage A 120 S, Sartorius, Göttingen
FPLC-Chromatographieranlage, Pharmacia, Freiburg
Fractogel[®] EMD BioSEC, Merck, Darmstadt
Gelelektrophorese-Kammer Protean II, Biorad, München
Geltrocknungsrahmen, Novex, San Diego, USA
Glasgeräte (diverse), Schott, über Jürgens, Hannover
Haushaltsmixer, Bosch, über Brinkmann, Hannover
HPLC-Chromatographiesystem, Applied Biosystems, Weiterstadt
HPLC-Säule RP C-18/300, Brownlee Aquapore, über Applied Biosystems, Weiterstadt
Kamera incl. UV-Transilluminator, Biorad, München
Laminar-Air-Flow, Flow Laboratories GmbH, München
Leersäule (Ø 1,6 cm, H: 30 cm), Amicon, Witten
Magnetrührer MR2002, Heidolph, über Jürgens, Hannover
Mikroskop Laborlux 12, Leitz, Wetzlar
Multipette, Eppendorf, Hamburg

Naßblotapparatur, Idea Scientific Company, Minneapolis, USA
Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim
pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar, (Max. 1000, 100 und 10 µl), Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipet-Boy, Integra Bioscience, Fernwald
Potter-Elvehjem-Homogenisator (Teflonstempel + Rührmotor) über Jürgens, Hannover
Proteinsequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Reaktionsröhrchen, Glas, über Jürgens, Hannover
Röntgenfilmentwicklungsgerät, Optimax, Hannover
Röntgenfilmkassetten (X-Omatic), Kodak, England
Rotationsverdampfer Rotavapor-R, Büchi, Schweiz
Rüttler, Heidolph, über Jürgens, Hannover
Schüttelwasserbad; GFL, Burgwedel
Schüttler (Tisch, universal), Braun, Melsungen
Semidry-Elektroblot-Apparatur, Schleicher & Schuell, Dassel
Speed Vac SVC 100, (Vakuumpumpe + Kühlfalle) Savant über Jürgens, Hannover
β-Counter, Canberra Packard, Frankfurt
β-Counter, Wallac 1409, Berthold, Bad Wildbad
Superose-12 HR10/30, Pharmacia, Freiburg
Toyopearl[®]MD[™]-P Butyl-Säule, TosoHaas, Stuttgart
Toyopearl[®]MD[™]-P SuperQ-Säule, TosoHaas, Stuttgart
Überkopfschüttler, über Jürgens, Hannover
Ultraschallgerät Labsonic 1510, Braun, Melsungen
Wassergewinnungsanlage Milli-QUFPlus, Millipore, Eichborn
96-well-Platteninkubator, Amersham, Amersham, UK
Zentrifugenröhrchen Polycarbonat (für Sorvall- und Beckmann-Zentrifuge)
Zentrifugen:
1.) Tischzentrifuge: Eppendorf 5415, Hamburg
2.) Tischzentrifuge, Sorvall RT 6000 B, DuPont, Bad Homburg
3.) Tischzentrifuge, Sigma 3K 12, Braun Biotech International
4.) Kühlzentrifuge: DuPont, Sorvall RC-2B (Rotor: SS34), Bad Homburg
5.) Ultrazentrifuge: Beckmann L8-M (Rotor: 70 Ti), USA
6.) Ultrazentrifuge: Beckmann L7-M (Rotor: Ti 50.2), USA
7.) Ultrazentrifuge: Beckmann TL-100 (Rotor: TL100.3), USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Cellophanpapier, Novex, San Diego, USA
Combitips, 0,05; 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5 ml, Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen, 24x32 mm, Omnilab, Bremen

Dialyseschläuche, Ausschlußgröße 10kD, über Jürgens, Hannover
Einmalhandschuhe, unsteril ohne Pulver, Ansell Medical, München
Filterpapier für Westernblot, Schleicher & Schuell, Dassel
HPTLC-Platten : Kieselgel 60, Merck, Darmstadt
Konzentrationseinheiten (Ausschlußgröße 10kD), Amicon, Witten
Kryoröhrchen, Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96 well ,Flachboden, unsteril ohne Deckel, Greiner, Nürtingen
Parafilm, American National, Can, Greenwich, USA
Pasteurpipetten, Brand, Wertheim
PCR-Röhrchen, Eppendorf, Hamburg
Pipetten steril, Greiner GmbH, Nürtingen
Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen, 10 ml, Elkay, Boston, USA
Polypropylen-Röhrchen, 15 ml, Nunc, USA
Polypropylen-Röhrchen, 50 ml, Nunc, USA
Polypropylen-Röhrchen, 5 , Nunc, USA
Polystyrol-Röhrchen, 5ml, Elkay, Boston, USA
PVDF-Membranen Immobilon P^{SQ}, Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße (klar oder amber), 1,5 ml, Safe-Look, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 1,5ml, Schnapp- o. Schraubdeckel (Gummidichtung), Sarstedt
Röntgenfilm X-Omat AR, Kodak, England
Spritzen, steril mit Kanülen , 50 ml, Braun, Melsungen
Ultrafree-15 (Ausschlußgröße 10 kD), Millipore, Eschborn
Zählröhrchen 5-20 ml, Canberra-Packard, Frankfurt
Zellkulturflaschen, Greiner GmbH, Nürtingen

2.2 Zelluläre Methoden

2.2.1 T-Zellpräparation (E⁺)

Um für die Zellexperimente sehr reine T-Zellen zu erhalten, wurden PBMC (Periphere, aus humanem Blut isolierte, mononukleäre Zellen) aus serumfreiem Spender-Blut („Buffy-Coat“) über einen Ficoll-Dichtegradienten präpariert und mittels Schafserythrozyten rosettiert.

Lösungen:

- Ficoll (Dichtegradientenlösung; (d = 1,077 g/ml)
- PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung); 9,55 g/l; pH 7.4
- Kulturmedium: RPMI
 - + 5 % FCS
 - + L-Glutamin (2 mM)
 - + Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
- Neuraminidase (1 U/ml)
- Schafserythrozyten (10 ml)
- Lysereagens: 7,47 g NH₄Cl pH 7.2
 - 2,06 g Tris
 - in 1 l Bidest

Durchführung:

Zunächst wurde der Buffy-Coat 1:2 in PBS (RT) verdünnt. Im 50 ml Rörchen wurden 25 ml Ficoll-Lösung vorgelegt und mit 25 ml Buffy-Coat bei RT überschichtet. Bei RT erfolgte eine Zentrifugation von 720xg für 30min, bei geringer Beschleunigung und Abbremsung. Danach konnte ein trüb-weißer Zellring (PBMC) zwischen der Ficoll-Lösung und dem PBS+Serum abgenommen und erneut in ein 50 ml Rörchen überführt und mit 50 ml PBS aufgefüllt werden. Nacheinander folgten dann zwei Waschschrte mit PBS bei RT und Zentrifugation für 10min (580 xg und 450 xg). Wenn eine Erythrozytenlyse notwendig war, wurde ein weiterer Waschschrte mit PBS durchgeführt. Nach Durchführung einer Zellzählung (im Medium) wurden eine Zellkonzentration von $6,67 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit Medium + 5 % FCS eingestellt. Danach konnten 9 ml dieser PBMC mit 1 ml Neuraminidase-behandelten (30 min, 37°C) und gewaschenen Schafserythrozyten (Sheep red blood cells = SRBC) versetzt werden. Es folgte eine Reaktion der E⁺-Zellen (entspricht den reinen T-Zellen) mit den SRBC im Wasserbad bei 37°C für 10 min, gefolgt von einer Zentrifugation für 15 min (580 xg). Das Rörchen mit dem Zellpellet wurde dann zur Verhinderung von Zellaggregationen für 30 min auf Eis gelagert und das Sediment im Anschluß resuspendiert und mit 10 ml Ficoll-Lösung unterschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation von 30 min bei 720 xg befanden sich die

E⁺-Zellen im Sediment und die E⁻-Zellen (entspricht den restlichen Zellen) bildeten eine Bande über dem Ficoll. Der Überstand wurde dann bis zum Sediment abgesaugt und eine Erythrozytenlyse mit 10 ml NH₄Cl (auf 37°C angewärmt) durchgeführt. Die E⁺-Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen (10 min, 580 xg) und das Pellet dann in Medium aufgenommen und für die Zellzählung resuspendiert.

2.2.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblau-Test durchgeführt. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf der Fähigkeit des Farbstoffs Trypanblau, durch Zellmembranen zu diffundieren und an cytosolische Proteine zu binden. Intakte Zellen transportieren den Farbstoff aktiv wieder hinaus, während tote Zellen blaugefärbt bleiben.

Lösungen:

- Trypan-Stammlösung: 0,5% (w/v) Trypanblau in 0,9% (w/v) NaCl
- Trypan-Gebrauchslösung: 1:5-Vorverdünnung der Stammlösung in PBS

Durchführung:

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit einem Teil der Trypanblau-Gebrauchslösung gemischt. Ein Teil davon wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl bestimmt. Teilweise oder ganz gefärbte Zellen wurden bei der Lebendzellzahlbestimmung nicht berücksichtigt.

2.2.3 Linolsäureeinbau

Lösungen:

- Kulturmedium: RPMI
+ 10% FCS
+ L-Glutamin (2 mM)
+ Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml]
- PHA: Stammlösung mit 1 mg/ml
- Linolsäure 1 mM in Ethanol
- ¹⁴C-Linolsäure (58 mCi/mmol, 0,05 mCi/0,5 ml)

Durchführung:

Zunächst wurde die eingesetzte ¹⁴C-Linolsäuresubstratlösung hergestellt. 260 µl Linolsäure (1 mM) + 26 µl ¹⁴C-Linolsäure wurden zusammengegeben und die Lösungsmittel unter Stickstoff zur Trockne abgedampft. Nach Resuspendierung in 400 µl Medium wurde die Lösung kurz ultraschallbehandelt.

In Polystyrol-Röhrchen wurden 100 µl Zellsuspension (1x10⁶ Zellen) mit 260 µl Medium ohne FCS mit 40 µl ¹⁴C-Linolsäuresubstratlösung 30, 60, 120 und 240 min bei 37°C im

Wasserbad inkubiert. Das vollständige Volumen wurde anschließend nach dem Prinzip von *Bligh and Dyer (1959)* vgl. Kapitel 2.5.1.1. delipidiert

2.3 Verwendung der 18-Amino-Ölsäure

Die Synthese von 18-(4'-Azido-2'-hydroxybenzoylamino)-oleoyl-CoA (ASO-CoA) wurde zum größten Teil von Prof. Dr. H. H. Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover durchgeführt. Der erste Schritt bestand darin, 18-Amino-Ölsäure (ein Ölsäure-Derivat) auf rein organisch-chemischem Wege zu synthetisieren (*Gehring et al., 1998*).

Aus der 18-Amino-Ölsäure konnte einerseits der Photoaffinitätsmarker ASO-CoA synthetisiert werden, wobei die Verknüpfung mit der CoA-Gruppe analog zur Synthese des Arachidonoyl-CoA (vgl. 2.4) durchgeführt wurde. Es mußte dabei aufgrund der Photosensitivität der Vorstufen unter Rotlicht gearbeitet werden.

Andererseits ergab sich mit der 18-Amino-Ölsäure eine Möglichkeit zur Kopplung der Ölsäure an Säulenmatrizen über die terminale Aminogruppe dar (vgl. 2.5.5.5.1)

2.3.1 Iodierung des Photoaffinitätsmarkers

Das photoreaktive ASO-CoA läßt sich mit ^{125}J markieren und kann somit zur radioaktiven Markierung von Proteinen genutzt werden.

Die Iodierung des ASO-CoA wurde nach *Cailla et al. (1976)* durchgeführt. Hierbei wird Chloramin-T in wäßriger Lösung langsam zu Hypochlorsäure zersetzt, die zur Oxidation von $^{125}\text{J}^-$ führt. Das gebildete $^{125}\text{J}^+$ kann mit einem pH-Optimum von pH 7.5 Hydroxyphenyl-Gruppen elektrophil angreifen.

Das vom Hersteller angebotene Na^{125}J muß vor Reaktionsbeginn angesäuert werden, da es für gewöhnlich in NaOH geliefert wird.

Lösungen:

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 mg/16,7 ml) in Natriumphosphatpuffer (I)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1,2 mg/ml) in Natriumphosphatpuffer (II)
- Natriumphosphatpuffer (0,5 M) pH 7,0
- Natriumchlorid (10%; w/v) in H_2O
- Chloramin-T (1 mg/ml) in Natriumphosphatpuffer
- Ethylacetat

Durchführung:

Da ASO-CoA ein photolabiler Coenzym-A-Ester ist, wurden alle Reaktionen unter Lichtausschluß (Rotlicht) durchgeführt. 500 μCi Na^{125}J , 50nmol ASO-CoA in LAT-Assay-Puffer und 50 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (I) wurden in einem Volumen von 150 μl zusammengegeben. Durch die Zugabe von 20 μl Chloramin-T (88 nmol) wurde die Reaktion gestartet. Nach Ablauf von 15min bei RT wurde die Reaktion durch Zusetzung von 50 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (II)

(315 nmol) beendet. Das Volumen wurde mit einer NaCl-Lösung auf 500 µl erhöht und das iodierter Produkt mittels Ethylacetat extrahiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.2 Photolyse des iodierten ASO-CoA

Die Markierung von Proteinen mit dem iodierten ASO-CoA erfolgte durch Photolyse. In einem Volumen von 50 µl wurde hierzu 0,3 µCi Photolabel (\pm Arachidonoyl-CoA als Kompetitor) zur jeweiligen Proteinprobe in LAT-Assay-Puffer gegeben und für 10min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 min bei 37°C erfolgte die Photolyse des Photoaffinitätsmarkers im Reaktionsgefäß auf einem UV-Tisch für 60 sec (260 nm Emission). Im Anschluß wurde die elektrophoretische Trennung der Proteine durchgeführt.

2.4 Synthese von Arachidonoyl-CoA

Nach einer von *Reitz et al. (1968)* beschriebenen Methode wurde die Synthese von Arachidonoyl-CoA (ACoA) aus Arachidonoylchlorid durchgeführt.

Lösungen:

- Coenzym A
- Arachidonoylchlorid
- Tetrahydrofuran (THF)
- NaOH
- Diethylether
- 10% (v/v) HClO₄

Durchführung

35 ml THF und 15ml H₂O Bidest wurden in einen Dreihalskolben gegeben. 50 mg Coenzym A wurden hinzugeführt und der pH auf pH 8.0 eingestellt. Das Arachidonoylchlorid (flüssig) wurde mit 500 µl THF verdünnt und in 50 µl-Portionen in den Kolben gegeben. Dabei mußte der pH-Wert mit 1N NaOH bei pH 8.0 konstant gehalten werden. Nach Reaktionsende wurde das Gemisch in einen 250 ml Rundkolben überführt und mit 10 %iger Perchlorsäure (500-1000 µl) auf pH 4.0 eingestellt. Perchlorsäure diente zur Präzipitation des Arachidonoyl-CoA-Salzes. Zum Schutz gegen Siedeverzüge wurden zusätzlich 100-200 µl Toluol zum Gemisch gegeben. Im Rotationsverdampfer wurde das THF unter N₂-Atmosphäre abgedampft. Zur Vervollständigung der Präzipitation wurden weitere 750 µl Perchlorsäure zur wäßrigen Phase gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 23.000 xg für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit etwas Perchlorsäure versetzt. Das Präzipitat wurde dann mit Diethylether zweimal gewaschen und bei 23.000 xg für 10 min zentrifugiert. Anschließend folgte die Lösung des Pellets in 8,5 ml LAT-Assay-Puffer unter Ultraschallbehandlung. 50 µl-Aliquote wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Bestimmung der Arachidonoyl-CoA-Konzentration erfolgte im Standard-LAT-Assay

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung der LAT-Aktivität

Die LAT-Aktivität kann mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren liegen dabei im wesentlichen in der Assay-Durchführungszeit und der Sensitivität.

2.5.1.1 Radioaktive LAT-Enzymaktivitätsbestimmung (LAT-Standard-Assay)

Die LAT setzt Lysophospholipide mit Acyl-CoA unter Freisetzung von CoA zu Phospholipiden (PL) um. Daher kann die LAT-Aktivität über die gebildete Menge von PL mit ^{14}C -LysoPC oder ^{14}C -Arachidonoyl-CoA bestimmt werden. Diese Methode ist die sensitivste unter den noch folgenden und wurde in dieser Arbeit überwiegend verwendet.

Lösungen:

- Substratlösung:

100 μM	$[^{14}\text{C}]$ -LPC, 5000 dpm/nmol
60 μM	Arachidonoyl-CoA
15 μM	BSA, 1,5 nmol

- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2 v/v)
- CHCl_3
- Eisessig
- Coomassie-Brillant Blue R-Färbelösung:

100 mM	NaCl
25 % (v/v)	MeOH
0,1 % (w/v)	Coomassie R
ad 1l	H_2O

Das Verhältnis von BSA zu Acyl-CoA sollte möglichst 1:4 betragen, wie sich bei einer Optimierung des Assays zeigte (*Wehmeier et al., 1995*).

Durchführung:

Ansatz: 100 μl Protein (0-50 μg)
100 μl Substratlösung

Der Ansatz wurde auf Eis (4°C) pipettiert. Dabei wurde die Substratlösung zuletzt zugegeben. Die Ansätze wurden 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 ml $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (2:1) gestoppt. Zur Extraktion von Lipiden aus der wässrigen Lösung wurde die Methode von *Bligh and Dyer (1959)* verwendet.

Dem Reaktionsansatz (200 μ l) wurden 1,5 ml Chloroform/Methanol (1:2) sowie 200 μ l H₂O zugesetzt. Nach Durchmischung entstand ein einphasiges System, das 30 min bei RT zur Delipidierung inkubiert wurde. Danach wurden jeweils 500 μ l Chloroform und 500 μ l H₂O zugegeben, wodurch nach Durchmischung ein zweiphasiges System resultierte. Um die Phasentrennung zwischen der oberen wäßrigen und unteren organischen Phase zu verbessern, wurde eine Zentrifugation bei 400 xg und 4°C für 10 min durchgeführt.

Die Volumenverhältnisse müssen hierbei exakt eingehalten werden, da es sonst nicht zur Phasentrennung kommt, was während der Delipidierung eine optimale Extraktion behindern würde. Die untere organische Phase wurde mittels einer Pasteurpipette abgesogen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Chloroform-Phase wurde dann bis zur Trockne eingengt. Die so extrahierten Lipide lassen sich im Kühlschrank bei 4°C bis zur DC-Trennung lagern.

2.5.1.1.1 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide:

Die nach *Bligh und Dyer (1959)* extrahierten Lipide lassen sich durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie trennen. Diese wurde auf Fertig-HPTLC-Platten (20x10 cm) durchgeführt. Für die Auftrennung eignen sich je nach Art der Lipidzusammensetzung Laufmittel unterschiedlicher Polarität.

Das hier verwendete Laufmittel ist ein Gemisch aus CHCl₃:MeOH:Eisessig:H₂O (50:25:8:2,5; v/v/v/v).

Durchführung:

Die Rückstände der Lipidextraktion wurden in 20 μ l CHCl₃ aufgenommen. Nach kurzem Schütteln wurden diese 20 μ l auf eine DC appliziert, auf die vorher entsprechende Standards (10 μ g) gegeben wurden. Die Standards dienen zur leichteren Identifizierung des jeweiligen Lipids nach Beendigung der Trennung. Die Trennung erfolgte mit 100 ml des Phospholipid-Laufmittels. Die Laufzeit betrug 30-35 min. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die DC-Platten bei RT (15 min) getrocknet und danach in einem Tauchbad mit Coomassie-Brillant Blue R-Färbelösung blau angefärbt (*Nakamura und Handa, 1984*). Die zu untersuchenden radioaktiven Lipidflecken wurden mit einer Rasierklinge herausgekratzt und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Im Standard-LAT-Assay wurde gebildetes PC als Produkt ausgekratzt. Die Röhrchen wurden mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und 10 sec geschüttelt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem β -Counter.

2.5.1.2 DTNB-Assay

Die LAT-Aktivität kann auch über die Freisetzung von CoA mittels DTNB (*Ellman et al., 1959*) gemessen werden (*Lands et al., 1965*). DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure))

wird auch Ellmann's Reagenz bezeichnet. Die Methode beruht auf der Bindung von freien SH-Gruppen, welche zur Bildung der gelben 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) führt. Diese Reaktion kann photometrisch bei 412nm kontinuierlich verfolgt werden. Als nachteilig erweisen sich allerdings die geringe Sensitivität im Vergleich zum radioaktiven Assay sowie die Sensitivität gegenüber SH-Reagentien und Acyl-CoA-Hydrolase-Aktivität.

Lösungen:

- DTNB-Lösung: DTNB (10 mM) in NaHCO₃ (30 mM) pH 7.4
- Assay-Puffer: Hepes (20 mM) pH 7.4 ; KCl (140 mM)
- LPC (200 µM) in Assay-Puffer
- Arachidonoyl-CoA (200 µM) in Assay-Puffer

Durchführung:

50 µl der Proteinprobe (10-50 µg) wurde in einer 96 well-Platte mit 50 µl DTNB-Lösung (2,5 mM final) und 50 µl Arachidonoyl-CoA (50 µM final) vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl LPC (50 µM final) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min bei 37°C in einem 96well-Platteninkubator erwärmt. Die Bildung von freiem Coenzym A wurde bei 412 nm in einem Photometer bestimmt.

2.5.1.3 Fluorimetrischer Assay

Eine deutliche Sensitivitätssteigerung im Vergleich zum DTNB-Assay konnte durch die Etablierung eines fluorimetrischen Assays erzielt werden. Das Prinzip dieses Assays liegt in der Bindung freier Coenzym A-Gruppen durch N-(9-Acridinyl)-Maleimid (NAM) (*Schäfer et al., 1993*).

Mit Hilfe dieses Assays wurde neben der Enzymaktivität auch der Anteil von freiem CoA im Arachidonoyl-CoA (s. 2.4 Arachidonoyl-CoA-Synthese) mit 1,5% bestimmt.

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer
- BSA 5mg/ml, fettsäurefrei (final 0,5mg/ml)
- NAM (N-(9 Acridinyl) maleinimid; St.: 2mM in wasserfreiem Aceton, Lagerung -20°C, lichtgeschützt; Gebrauchslösung: frisch angesetzt 0,2mM in LAT-Assay-Puffer; final 10µM)
- ACoA: 15mM (Gebrauchslösung: 600µM in LAT-Assay-Puffer; final 30µM)
- LPC-Stammlösung: 40mg/ml in CHCl₃/MeOH (Gebrauchslösung: 1,2mM in LAT-Assay-Puffer; final 60µM)

Alle Verdünnungen wurden in LAT-Assay-Puffer vorgenommen.

Durchführung:

In einer Halbmikroküvette (QS) wurden 700 µl LAT-Assay-Puffer, 100 µl BSA, 50 µl NAM sowie 50 µl ACoA zusammengegeben. Im Fluoreszenzphotometer (Extinktion 360 nm/Emission 435 nm) wurde dann für 1min die Basisfluoreszenz dieser Lösung gemessen. Es folgte die Zugabe von 50 µl Probe (SH-Reagentien wie Dithioerythrol wirken störend) und für 2 min eine Aufnahme der neuen Basislinie. Erst nach Zugabe von 50µl LPC konnte die Enzymaktivität über 7 min registriert werden.

2.5.2 Proteinbestimmung (BCA-Test)

Der Proteingehalt der verschiedenen Enzympräparationen wurde photometrisch durch Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) als Farbreagens ermittelt (*Smith et al., 1985*). Das Prinzip der Nachweisreaktion ist die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) unter gleichzeitiger Oxidation von Aminosäuren in alkalischer Lösung. Cu(I) bildet dann mit BCA einen violetten Komplex. Der BCA-Test wurde aufgrund seiner hohen Toleranz gegenüber verwendeten Puffersubstanzen und besonders Detergentien benutzt.

Lösungen:

- Komponente I: Na₂CO₃, NaHCO₃, Bicinchoninsäure, Natrium-Tartrat in NaOH (0,1 N)
- Komponente II: CuSO₄·5H₂O (4 %; v/v)
- Komplette Reaktionslösung: I + II (50 + 1 v/v); vor Gebrauch frisch hergestellt
- BSA-Standard-Lösungen: 6,25 µg/ml bis 200 µg/ml in jeweiliger Puffersubstanz

Durchführung:

Die Proteinbestimmung wurde in Doppelansätzen auf einer 96-well-Platte durchgeführt. Die Eichreihe (6,25 µg/ml bis 200 µg/ml) wurde aus einer BSA (Bovine Serum Albumin) Stammlösung (1 mg/ml) angesetzt. 50 µl Probe wurden dann mit 150 µl der kompletten BCA-Reaktionslösung versetzt. Danach wurde die 96-well-Platte für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 550 nm.

2.5.3 Präparation aktiver Enzymfraktionen

Die Präparation von aktiven Enzymfraktionen aus humaner Plazenta verlief über mehrere Fraktionierungsschritte und führte zu verschiedenen lagerfähigen Überständen, die für eine Reihe von chromatographischen Untersuchungen genutzt wurden.

2.5.3.1 Darstellung von Zellmembranen aus Plazenta

Lösungen:

- LAT-Präparationspuffer:

250 μ M	Saccharose
50 mM	Tris-HCl, pH 7.4
1 mM	EDTA
20 % (v/v)	Ethylenglykol

Der LAT-Präparationspuffer enthielt Protease-Inhibitoren in folgender finaler Konzentration: Bestatin (35 μ g/ml), Leupeptin (2,5 μ g/ml), Pefabloc (0,3 mg/ml), Pepstatin (7 μ g/ml) und E-64 (2,85 μ g/ml).

- LAT-Assay-Puffer: Es wurde eine 10 fach konzentrierte Stammlösung hergestellt.

1,5 M	NaCl
100 mM	Tris-HCl, pH 7.4
10 mM	EDTA

Durch 1:10-Verdünnung wurde die Gebrauchslösung (1x) erzeugt.

Durchführung:

Die gesamte Präparation erfolgte bei 4°C bzw. auf Eis. Eine tiefgefrorene Plazenta (ca. 300 g) wurde in 500 ml LAT-Assay-Puffer (Verhältnis Plazenta:Puffer ca 1:2) langsam aufgetaut, anschließend in einem Haushaltsmixer vorzerkleinert und das Homogenat mit Hilfe eines Homogenisators (Teflonstempel mit Rührmotor) unter ständiger Kühlung homogenisiert. Der weitere Aufschluß der Zellen erfolgte durch eine Behandlung mit Ultraschall für 10 min bei 20 Watt in einem Eisbad. Vor der Zentrifugation wurde das Homogenat zur Abtrennung von Bindegewebe und Fett über ein feines Drahtsieb gestrichen.

In einem ersten Zentrifugationsschritt wurden bei 20.000 xg und 4°C für 60 min noch intakte Zellen, Zelltrümmer, Kerne u. a.m. abgetrennt. Die Plazentamembranen konnten durch einen zweiten Zentrifugationsschritt von 90 min und 4°C und 200.000 xg isoliert werden. Das Sediment wurde mit wenig LAT-Präparationspuffer gewaschen und anschließend mit dem gleichen Puffer resuspendiert (Faustregel: 8 ml Puffer werden zum Suspendieren von Sedimenten aus vier Zentrifugenröhrchen eingesetzt.). Zur weiteren Homogenisierung wurde die Suspension mehrmals (5-6 mal) in einer 5 ml Einwegspritze mit Kanüle resuspendiert und anschließend nochmals in einem Teflonpotter homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 1 ml-Aliquots in Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert. Die Enzymaktivität blieb mit dieser Methode über mehrere Monate stabil.

2.5.3.2 Präparation der integralen (iLAT) und peripheren LAT (pLAT) aus Zellmembranen

Zur Abtrennung von Begleitproteinen und der Trennung in eine salzlösliche und eine membranständige Komponente wurden die Ausgangsmembranen (engl.: crude Membranen, CM) aus Kapitel 2.5.3.1 weiter fraktioniert.

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer s.2.5.3
- NaCl-Lösung: 5 M
- Detergenzlösung: 150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
100 mM CHAPS

Durchführung:

Die aus Plazenta präparierten Zellmembranen wurden in LAT-Assay-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml und eine NaCl-Konzentration von 1 M eingestellt und dann für 45 min bei 4°C inkubiert. Die Suspensionslösung wurde für 60 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (ÜS₁), der die pLAT enthält, wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das Pellet (P₁) wurde in der Hälfte des Ausgangsvolumens mit der Detergenzlösung resuspendiert und anschließend 15 s bei 20 Watt mit Ultraschall behandelt. Die homogene Lösung wurde dann erneut 60 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der CHAPS-Überstand wurde in Aliquots bei -20°C eingefroren. Das Pellet P₂ enthält die membrangebundene iLAT-Aktivität. Es wurde in LAT-Assay-Puffer mit Hilfe eines Potters und einer feinen Spritze resuspendiert und ebenfalls in Aliquoten bei -20°C gelagert. Die Enzymaktivität war über mehrere Monate stabil.

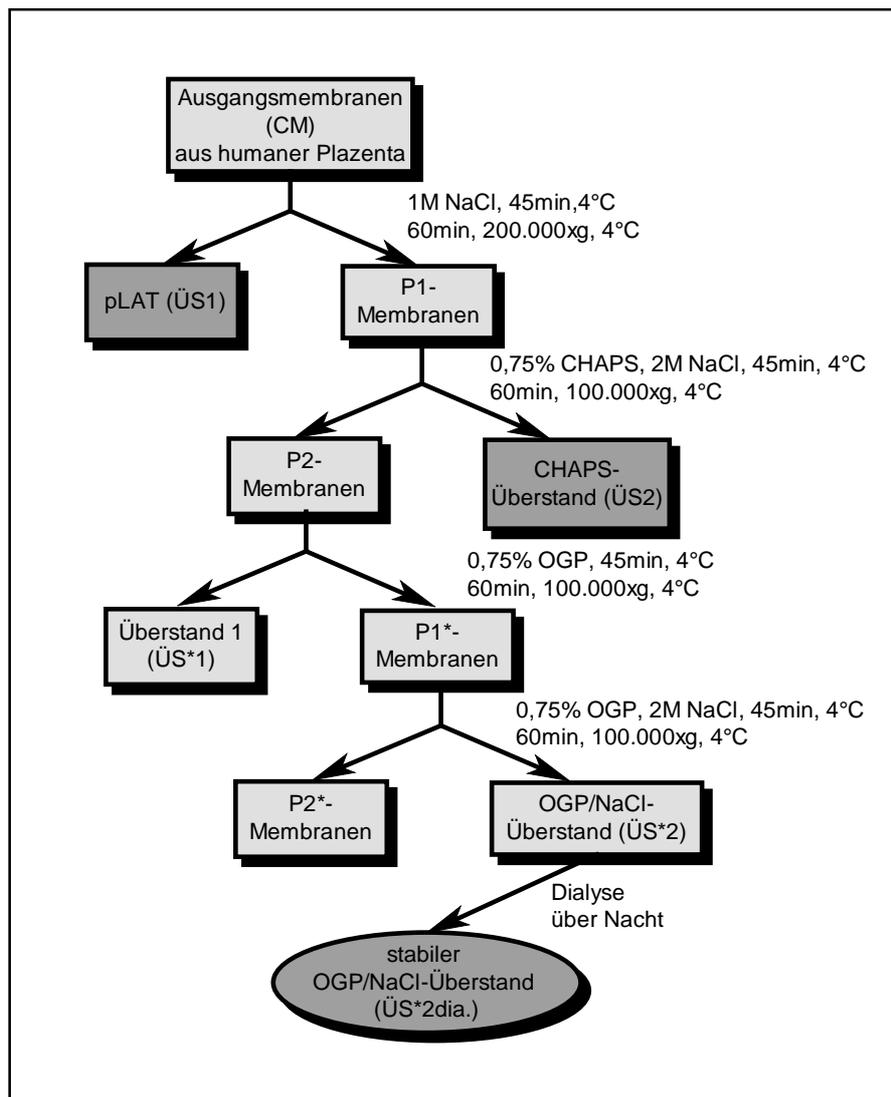


Abb.2.5.1: Darstellung der Präparationsstufen der LAT. In der Arbeit verwendete aktive Fraktionen sind dunkelgrau unterlegt.

2.5.3.3 Präparation des OGP/NaCl-Überstandes (ÜS_{2 dia})

Für die weitere Solubilisierung der LAT-Aktivität aus den P₂-Membranen (iLAT) wurde das nicht-ionische Detergenz n-Octylglucopyranosid (OGP) verwendet. Zur Senkung der kritischen micellaren Konzentration (CMC) wurde dieses Detergenz in Kombination mit NaCl benutzt. Die Bestimmung der CMC von OGP in Abhängigkeit von verschiedenen NaCl-Konzentrationen wurde fluorimetrisch nach der Methode von *Chattopadhyay et al. (1984)* durchgeführt.

Lösungen:

- 10 % (w/v) OGP in H₂O
- 5 M NaCl in H₂O
- 0,5 mM DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien) 1:20 in THF verdünnt

Durchführung:

In einem 1ml Ansatz wurden 0-1 % OGP und 0-2 M NaCl in H₂O zusammengegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 5 µl DHP versetzt und bei RT unter Lichtausschluß für 30 min inkubiert. Dann wurde die Fluoreszenz gemessen.

Hieraus resultierte das im folgenden beschriebene zweistufiges Verfahren, welches die Abtrennung gering aktiven Proteins im ersten Schritt ermöglichte.

Lösungen:

- 5M NaCl
- LAT-Assay-Puffer s. 2.5.3
- 10% (w/v) OGP

Durchführung:

Im ersten Schritt der Extraktion wurden P₂-Membranen mit LAT-Assay-Puffer auf 10 mg/ml und mit OGP auf 0,75 % (w/v) eingestellt und bei 4°C für 45 min im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 60 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (P₁*) resuspendiert. Nach einer Proteinbestimmung schloß sich der zweite Extraktionsschritt an. Es erfolgte eine Einstellung auf 10mg/ml Protein, 0,75 % (w/v) OGP und 2M NaCl. Nach einer 45minütigen Inkubation bei 4°C wurde erneut für 60 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der resultierende OGP/NaCl-Überstand bei 4°C über Nacht gegen 20 % (w/v) Glycerin in 500 fachem Überschuß LAT-Assay-Puffer dialysiert.

Dieser aktive OGP/NaCl-Überstand wurde im folgenden für alle chromatographischen Schritte eingesetzt.

2.5.4 Komplexzerlegung und Rekonstitution

Aus verschiedenen Experimenten (Gelfiltration, Ultrafiltration etc.) gab es Indizien für die Existenz größerer Protein-Aggregate bzw. Komplexe. Um diese in kleinere, aber dennoch aktive Untereinheiten zu zerlegen, wurden Versuche zur Stabilität gegenüber verschiedenen Detergentien durchgeführt.

Detergentien der Wahl waren dabei das zwitterionische CHAPS und das nicht-ionische OGP. In Hinblick auf eine Rekonstitution wurde auch Cholat getestet, da dieses bei Entfernung in Gegenwart von Liposomen eine Rekonstitution erleichtert (*Ambesi et al., 1991*).

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer
- Cholat, 10 % (w/v) in LAT-Assay-Puffer
- OGP, 10 % (w/v) in LAT-Assay-Puffer
- CHAPS, 10 % (w/v) in LAT-Assay-Puffer

Durchführung.

100 µg OGP/NaCl-Überstand wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Detergens in einem 1 ml Ansatz versetzt und 45 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 100 µl direkt im Assay auf LAT-Aktivität untersucht.

2.5.4.1 Rekonstitution

Die Behandlung mit Detergentien führt häufig zum Aktivitätsverlust (teilweise oder vollständig). Eine Rekonstitution des Enzyms kann u. U. die Enzymaktivität wiederherstellen. Zur Rekonstitution wurden verschiedene, nachfolgend genannte Lipide (natürliche Erythrozyten-Lipide und artifizielle Liposomen) hergestellt und mittels unterschiedlicher Verfahren eingesetzt.

2.5.4.1.1 Liposomendarstellung

Lösungen:

- Phosphatidylcholin (PC), 10 mg/ml
- Phosphatidylethanolamin (PE), 10 mg/ml
- Cholesterin (Ch), 10 mg/ml
- Phosphatidylserin (PS), 10 mg/ml
- Sphingomyelin (SPM), 10 mg/ml

Durchführung

Liposomen-Herstellung:

Zur Herstellung der Liposomen wurden

- A) 5 mg PC, 3 mg PE und 1 mg PS (9 mg/ml),
- B) 10 mg PC, 1,5 mg Ch, 1 mg PE und 1 mg SPM (13,5 mg/ml), oder
- C) 10 mg PC und 1,5 mg Ch (11,5 mg/ml)

in Chloroform vermischt. Diese Lösung wurde unter Stickstoff vollständig eingengt und der Lipidfilm mit 1ml LAT-Assay-Puffer resuspendiert und zur Suspensierung der Phospholipide 5 min mit Ultraschall behandelt. Diese Liposomen waren bei 4°C ca. eine Woche lagerfähig.

Erythrozyten-Lipide:

Mit Erythrozytenkonzentraten wurde eine Membranpräparation (analog zu Kapitel 2.5.3.1) durchgeführt. Das finale Membranpellet wurde, wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben, delipidiert und zur Trockne eingengt bei -20°C gelagert. Die Zugabe von 500 µl Chloroform zu einem Konzentrat ergab eine Phospholipid-Konzentration von ca. 1 mg/ml (Vergleich mit Standards nach einer DC-Trennung).

2.5.4.1.2 Rekonstitutionsmethoden

Die Rekonstitution kann einfach durch Zugabe von Phospholipiden zur Protein/Detergenslösung erfolgen, in der Hoffnung auf Reaggregation kompatibler Komponenten. In der Regel ist aber die Entfernung des Detergens notwendig. Dieses führt zur bevorzugten Bildung von Phospholipid/Protein-Mizellen gegenüber den Detergens/Protein-Mizellen. Für diese Zwecke wurden einige Methoden getestet.

I. Verdünnung:

Die einfachste und schnellste Methode ist die Verdünnung der Detergengkonzentration unterhalb ihres CMC-Wertes (hier reichte oft eine 1:10-Verdünnung). Die Mizellenbildung des Detergens wird verringert. Fraglich war dabei, ob Phospholipide und Protein in gleicher Geschwindigkeit zu aktiven Komplexen aggregieren können.

II. Dialyse:

Die Dialyse (hier im 1,5 ml Reaktionsgefäß oder über eine Dialysesäule durchgeführt) führt zum gleichen Ziel, läßt einer Reorganisation des Proteins aber deutlich mehr Zeit. Kritischer Punkt war hier die Konzentrationsbestimmung der Detergentien und damit die Effektivität der Dialyse.

III. Detergens-Adsorber-Gel

Das Detergens-Adsorbermaterial ist eine sehr hydrophobe Matrix aus makroporösen Polymer-Partikeln zur Entfernung von Detergentien und hydrophoben Substanzen aus Proteinlösungen. Eine rasche Bindung von Detergens (die theoretische Kapazität liegt bei 61 mg CHAPS/ml Adsorbergel bzw. 103 mg im Fall von OGP, bei 1 h und 4°C) steht hier dem Nachteil der gleichzeitigen Bindung hydrophober Proteine gegenüber. Der Einsatz beschränkte sich daher auf die Anwesenheit im Dialysepuffer zur Verstärkung der Dialyse.

2.5.5 Chromatographische Separation

Proteinreinigungen können über Säulenchromatographie verschiedenster Art durchgeführt werden. Zum Teil sind Niederdrucksäulen für diesen Zweck effizient genug, manchmal ist eine Trennung erst unter HPLC-Bedingungen zu erreichen. Letztere Methode läßt sich nur auf sehr stabile Proteine und Peptide anwenden. Um eine Separation großer nativer Moleküle zu bewerkstelligen, sind in der Regel wäßrige Salzlösungen notwendig, die zudem herkömmliche HPLC-Anlagen korrodieren.

Die chromatographischen Trennungen wurden hier mit einem FPLC-System der Firma Pharmacia LKB Biotechnology bei 4°C durchgeführt. Die notwendigen Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert (0,2 µm Ausschlußgrenze) und auf 4°C temperiert.

2.5.5.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Form der Verteilungschromatographie, die zur Trennung von Molekülen unterschiedlicher Größe verwendet wird. Das Prinzip dieser Chromatographie beruht auf der Verteilung der Moleküle zwischen der Lösung und einer porösen stationären Gelmatrix. Aus einem Proteingemisch können kleine Proteine in die Matrixporen und somit ins Innere eindringen, während große ausgeschlossen bleiben. Auf diese Weise verbleiben kleine Moleküle im Vergleich länger auf der Säule und eluieren erst nach den großen Molekülen.

Allerdings zeigen nichtglobuläre Proteine manchmal ein anormales Laufverhalten.

Das Ausschlußvolumen kann über die Verwendung großer Moleküle (hier Dextranblau mit 2000 kDa) und das Bettvolumen über den Einsatz eines kleinen Moleküls (hier 0,3 % (v/v) Aceton) ermittelt werden. Für das Trennergebnis ist es besonders wichtig, das Auftragsvolumen unter 5 % des Bettvolumens zu halten.

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer

Durchführung:

Die hier verwendete Fractogel[®] EMD BioSEC-Säule der Fa. Merck zeigt einen Trennbereich zwischen 5 und 1000 kDa. Die Säule hat ein Bettvolumen von 72 ml und ein Ausschlußvolumen von 35 ml. Das Protein wurde in LAT-Assay-Puffer unter einer Flußrate von 1ml/min aufgetragen und unter LAT-Assay-Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Aufschluß über den Separationserfolg lieferte der Gebrauch von Standardproteinen (Ferritin 440 kDa, Katalase 232 kDa, Aldolase 158 kDa, BSA 65 kDa und Lysozym 14,3 kDa).

Die Säule wurde mit 0,5 M NaOH regeneriert und unter 20 % (v/v) Ethanol in H₂O gelagert.

2.5.5.2 Anionenaustauscher

Ionenaustauscherchromatographie bedeutet die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Ladung (*Scopes et al., 1982*). Die Separation einzelner Proteine wird dabei durch eine Gleichgewichtsverteilung zwischen der gepufferten mobilen Phase und der stationären Phase, welche aus einer Matrix mit geladenen anorganischen Gruppen besteht, erreicht. Die Matrix ist entweder mit negativen (Kationenaustauscher) oder positiven Ladungsträgern (Anionenaustauscher) versehen und bindet entgegengesetzt geladene Proteine. Die Bindung des Proteins ist sehr vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers, der Dichte der Ladungen auf der Matrix und insbesondere vom isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins abhängig. Zur Elution werden Puffer mit sogenannten Gegenionen verwendet, die die Bindung des Proteins an die stationäre Matrix sukzessive aufheben.

Die hier verwendete Toyopearl[®]MD[™]-P SuperQ-Säule der Fa. TosohHaas hat quarternäre Aminogruppen auf ihrer Matrix.

Der Probenauftrag erfolgt bei niedriger Salzkonzentration. Nach einem Waschschrift können die gebundenen Proteine durch einen steigenden Salzgradienten eluiert werden.

Lösungen:

- Puffer I: Tris 10 mM pH 8.5
- Puffer II: Tris 10 mM pH 8.5 + 1M NaCl

Durchführung:

Das Protein wurde in Puffer I gelöst und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Mit 10 ml wurde die 4 ml SuperQ-Säule zunächst bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 20 % Puffer II gewaschen (200 mM NaCl). Es folgte ein steigender NaCl-Gradient über 10 ml bis zu 80 % Puffer II (800 mM NaCl). Ein weiterer Gradient schloss sich daran an mit bis zu 100 % Puffer II (1000 mM NaCl).

Die Säule wurde mit 0,5 M NaOH regeneriert und unter Ethanol 20 % (v/v) in H₂O gelagert.

2.5.5.3 Hydrophobizitätschromatographie

Ein einfaches Tertiärstrukturmodell von Proteinen beschreibt diese als Struktur mit hydrophiler Hülle und hydrophoben Kernbereichen. Es kann bedingt, durch Aminösäuren wie z. B. Methionin, aber auch Oberflächenhydrophobizität in Form von Domänen auftreten.

Die Zahl, Größe und Verteilung dieser Regionen ist charakteristisch für das Protein und kann als Grundlage der Trennung ausgenutzt werden (*Kennedy, 1990*). Tritt ein hydrophobes Protein in die Nähe einer hydrophoben Matrix, so kommt es zu nicht-ionischen

Wechselwirkungen, die sehr vom Milieu abhängen. Hohe Konzentrationen bestimmter Ionen verstärken die hydrophoben Wechselwirkungen, während chaotrope Salze das Gegenteil bewirken (*Hofmeister-Serie*).

Bei der Hydrophobizitätschromatographie werden die Proteine daher unter Hochsalzbedingungen aufgetragen und mit einem abnehmenden Salzgradienten eluiert.

Die hier verwendete Toyopearl[®]MD[™]-P Butyl-Säule der Fa. TosoHaas hat ein Bettvolumen von 4ml.

Lösungen:

Puffer I: 10 mM Tris, pH 7.4 + 2 M NaCl + 0,5 % (v/v) OGP

Puffer II: 10 mM Tris; pH 7.4 + 0,5 % (v/v) OGP

Durchführung:

Die Proteinprobe wurde in Puffer I gelöst und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 10 ml Puffer I bei einer Flußrate von 1 ml/min gewaschen. Danach wurde über 10 ml ein absteigender Salzgradient gewählt (final 0 M NaCl). Zuletzt schloß sich eine Elution mit 100 % Puffer II über 10 ml an. Nach dem Gebrauch wurde die Säule mit Ethanol 70 % (v/v) in H₂O gereinigt und unter Ethanol 20 % (v/v) + Natriumazid 0,02 % (w/v) gelagert.

2.5.5.4 Hydroxylapatit

Kristallines Hydroxylapatit (HA) ist ein Calciumphosphatmineral. An der Bindung von Protein sind dabei Ca²⁺- und PO₄³⁻-Gruppen über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen involviert. Saure und neutrale Proteine binden dabei an die Ca²⁺- Gruppen und basische Proteine adsorbieren an die PO₄³⁻-Gruppen des Hydroxylapatits (*John et al., 1984*). Denaturierte Proteine oder Peptide (z. B. einzelne Aminosäuren) mit geringem Molekulargewicht (MW) binden dagegen nur sehr schlecht.

Der Probenauftrag wird normalerweise unter geringen Pufferkonzentrationen bei neutralem pH-Wert durchgeführt. Wichtig ist die Abwesenheit von Substanzen mit hoher Affinität für Ca²⁺ bzw. PO₄³⁻, da diese die Kapazität der Säule verringern würden (*Bernadi et al., 1971*).

Die Elution basischer Proteine wird unter schrittweiser Erhöhung der einwertigen Kationenkonzentration (Anionen: z. B. Cl⁻ oder PO₄³⁻) durchgeführt oder alternativ mit geringen Konzentrationen zweiwertiger Kationen. Im Gegensatz dazu werden saure Proteine mit Phosphat oder Fluoridlösungen eluiert. Saure und neutrale Proteine eluieren schon zwischen 30 und 120 mM Phosphat. Divalente Kationen führen eher zu stärkerer Bindung saurer Proteine an HA (*Gorbunoff et al., 1984*).

Hydroxylapatit (HA) wird in unterschiedlichen Formen angeboten. Keramisches HA hat gegenüber dem kristallinen HA den Vorteil der höheren mechanischen und chemischen Stabilität (gesintert) woraus eine höhere Flußrate resultiert.

Lösungen:

- Puffer I: Kaliumphosphat 10 mM, pH 7
- Puffer II: Kaliumphosphat 500 mM, pH 7
- Puffer III: Kaliumphosphat 10 mM, pH 7 + 1 M KCl
- Puffer IV: Kaliumphosphat 500 mM, pH 7 + 1 M KCl

Durchführung:

Aus dem keramischen Hydroxylapatit der Fa. Biorad wurde eine 7 ml Säule hergestellt und mit Puffer I äquilibriert. Das Protein wurde in Puffer I aufgenommen und mit einer Flußrate von 4 ml/min auf die HA-Säule aufgetragen. Im Folgenden wurde die HA-Säule zunächst mit 14 ml Puffer I gespült (Phosphat-Konzentration: 10 mM, Flußrate 1 ml/min). Es folgte die Elution mit einem Gradienten von 35 % Puffer II bis 44 % Puffer II über 20 ml (finale Phosphat-Konzentration: 220 mM). Puffer I wurde gegen Puffer III und Puffer II gegen IV ausgetauscht. Ein zweiter Gradient von 44 % Puffer III bis 100% Puffer III wurde über 18 ml durchgeführt (finale Phosphat-Konzentration: 500 mM).

Die Regeneration der Säule wurde nach 3-5 Läufen mit 400 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6.8 bzw. 2 M NaCl durchgeführt. Die Lagerung erfolgte unter Puffer I + 20 % (v/v) Ethanol mit 0,02 % (w/v) Natriumazid.

2.5.5.5 Affinitätschromatographie

Die Liganden-Affinitätschromatographie ist eine der effektivsten Reinigungsmethoden der Proteinbiochemie. In guten Fällen können Reinigungsfaktoren von 1000 bei Ausbeuten von 10-50 % erreicht werden. Das Prinzip basiert auf der Kopplung eines spezifischen Liganden des Zielproteins über einen Abstandhalter an eine Matrix. Bleiben bei der Kopplung die Ligandenbindungseigenschaften erhalten, so kann die Matrix das gesuchte Protein selektiv binden. Nach einem Waschschrift kann das Protein z. B. mit dem gleichen Liganden oder unter veränderten Pufferbedingungen eluiert werden.

Problematisch zeigen sich die Auswahl eines spezifischen Liganden, des Abstandhalters und der Matrix. Kleine Modifikationen (z. B. eine Ladung oder ein hydrophober Abstandhalter) können aus einer Affinitätssäule schnell eine Ionentauscher- oder Hydrophobizitätssäule machen.

2.5.5.5.1 18-Amino-Ölsäure als Ligand in der Affinitätschromatographie

Ölsäure zeigte sich in Wettbewerbsstudien als ausgezeichneter Konkurrent aber schlechtes Substrat der LAT (*Kerkhoff et al., 1998*) und versprach damit, der beste Kandidat als Fettsäureligand für die Affinitätschromatographie zu sein. Die Ölsäure lag für die Kopplung modifiziert als 18-Amino-Ölsäure vor (hergestellt von Prof. Dr. H. H. Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover). Die 18-Amino-Ölsäure wurde an zwei verschiedene Matrizen gekoppelt.

2.5.5.5.1.1 Kopplung an aktivierte CH-Sepharose 4B

Nach Ermittlung der Lösungsbedingungen wurde die Kopplung der 18-Amino-Ölsäure an CH-Sepharose 4B wie folgt durchgeführt.

Lösungen:

- Aktivierte CH-Sepharose 4B
- 1 mM HCl
- MeOH p.a.
- Eisessig
- 1 M NaOH
- 0,1 M Tris HCl pH 8
- 0,1 M Natriumacetat pH 7.7
- LAT-Assay-Puffer
- Ethanol (20 % w/v)

Durchführung:

Für die Herstellung einer ligandengekoppelten- und einer Kontrollsäule ohne Ligand wurden 1,33 g aktivierte CH-Sepharose 4B in 15 ml eiskalter 1 mM HCl suspendiert. Nach einer Stunde Quellzeit wurde das Säulenmaterial 15 min mit 200 ml 1 mM HCl/g auf einer Glasfritte gewaschen. Danach wurden die 4ml Volumen in 2 ml Aliquots getrennt weiterbehandelt.

Für die Kopplungsreaktion wurde eine 10 facher Ligandenüberschuß gewählt. Bei einer theoretischen Kapazität von 16 μmol Glycylleucine in 2 ml Gelsuspension entsprach die Ligandenmenge 160 μM 18-Amino-Ölsäure (0,00016 mol bzw. 43 mg). Die 18-Amino-Ölsäure wurde in 6 ml MeOH + 300 μl Eisessig gelöst. Die pH-Kontrolle ist sehr wichtig, da das pH-Optimum der Kopplungsreaktion bei pH 8 liegt. Bei diesem Wert ist die Hydrolyse des aktiven Esters niedriger und α -Aminogruppen werden gegenüber ϵ -ständigen bevorzugt gekoppelt. Der pH-Wert konnte mit NaOH löslichkeitsbedingt nur auf pH 5 eingestellt

werden. Die Kopplung wurde über einen Zeitraum von 14 h bei 4°C im Überkopfschüttler durchgeführt.

Zur Entfernung von überschüssigem Ligand wurde die Suspension zuerst mit 7 ml MeOH gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mittels 0,1 M Tris-HCl und 0,1 M Natriumacetat abgeblockt. Nach dem Gießen der Säule wurde diese unter 20 % (v/v) Ethanol gelagert. Die Kontrollsäule wurde identisch behandelt, allerdings ohne Ligandenzusatz.

2.5.5.5.1.2 Kopplung an NHS-aktivierte Sepharose

Die Kopplung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Lösungen:

- 18-Amino-Ölsäure
- 1 M NaOH
- 1 M und 1 mM HCl
- EtOH 70 % (v/v)
- Puffer A: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl; pH 8
- Puffer B: 0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl; pH 4
- 0,05 M Na₂HPO₄ + 0,1 % (w/v) NaN₃ pH 7

Durchführung:

Ein 10 facher Überschuß von 18-Amino-Ölsäure (27 mg) wurde in 2,5 ml EtOH 70 % (v/v) bei RT gelöst und auf pH 11 eingestellt. Die 1 ml „HiTrap“-Säule wurde zunächst mit 3x2 ml eiskalter 1 mM HCl bei einer maximalen Flußrate von 1 ml/min (1/2 Tropfen/Sekunde) gespült, um Isopropanol aus der Säule zu entfernen. Unmittelbar danach wurde die 2,5 ml Ligandenlösung appliziert und mittels zweier Plastikspritzen über einen Zeitraum von 30 min bei RT mehrfach durch die Säule gedrückt. Eine Vergleichssäule ohne Ligand wurde identisch behandelt.

Die Lagerung der Säulen erfolgte unter 0,02 % (v/v) Natriumazid in LAT-Assay-Puffer.

2.5.5.5.2 Kopplung von N-Palmitoyloxysuccinimid an EAH-Sepharose

Palmitoyl-CoA und Palmitinsäure zeigten sich in LAT-Kompetitionsstudien im Vergleich zur Ölsäure ebenfalls als gute Kompetitoren (*Kerkhoff et al., 1998*) und wurden deshalb ebenfalls als Fettsäureliganden verwendet.

Lösungen:

- Ethylacetat
- LAT-Assay-Puffer
- 0,5 M NaCl

Durchführung:

Nach Resuspension wurden 10 ml Gelsuspension (120 μ mol aktive Gruppen) mit 900 ml 0,5 M NaCl auf einer Fritte gewaschen und hinterher auf 15 ml eingestellt. 213 mg N-Palmitoyloxysuccinimid (5 facher Überschuß bzw. 0,6 mmol) wurden in 25 ml Ethylacetat gelöst. Beide Lösungen hatten ohne Einstellung pH 5. Für die Kopplung wurde der Ligand portionsweise (2 ml) unter Schwenken zum Gelmaterial gegeben und der pH-Wert konstant bei pH 5 gehalten. Nach der Zugabe des Liganden wurde die Kopplungsreaktion für 14 h bei 4°C weitergeführt. Zum Entfernen des überschüssigen Liganden wurde 5 mal 10 min mit 20 ml Ethylacetat und 10 mal 10 min mit H₂O gewaschen. Darauffolgend konnte das Säulenmaterial in eine Säule überführt und mit LAT-Assay-Puffer equilibriert werden. Eine Vergleichssäule ohne Ligand wurde, wie oben beschrieben, hergestellt.

Es wurden verschiedene NaCl-Gradienten und der Einsatz von Detergentien zur spezifischen Elution der LAT-Aktivität getestet.

Die Lagerung beider Säulen erfolgte unter 20 % (v/v) Ethanol in Bidest.

2.5.5.5.3 Palmitoyl-CoA-Agarose

Bei der Palmitoyl-CoA-Agarose handelt es sich um ein käufliches Produkt der Fa. Sigma. Die Agarose ist zu 4 % mit Palmitoyl-CoA bedeckt.

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer
- LAT-Assay-Puffer; 3 % (w/v) OGP

Durchführung:

Eine Equilibrierung der Palmitoyl-Agarose mit LAT-Assay-Puffer wurde vor jedem Lauf durchgeführt. Dann konnte der aktive Enzymüberstand auf das Säulenbett aufgetragen werden. Mittels eines Gradientenmischers und einer Pumpe (für lineare Gradienten) wurde ein Gradient von 0-3 % (v/v) OGP erzeugt. Mit einem Fraktionssammler wurden alle Fraktionen aufgefangen und auf LAT-Aktivität überprüft.

2.5.5.5.4 Phase-Transition Chromatographie mit Transil[®]

Ein völlig neuartiges Verfahren der Proteinchromatographie wird als Phase-Transition Chromatographie bezeichnet. Dabei werden die biophysikalischen Eigenschaften einer lipidähnlichen Beschichtung auf polymerem Silica (Transil[®] der Fa. Nimbus) dazu genutzt, um Proteinbindung und -elution thermisch zu regulieren. Zusätzlich kann auch mit Salz- oder pH-Gradienten gearbeitet werden.

Das Transil[®]-Material wurde zum Zweck der LAT-Aufreinigung mit 5 % LysoPC (1-Palmitoyl-2-hydroxy-PC) auf PC-Hintergrund (DMPC) beschichtet. Das Trägermaterial ist sphärisches Silica (30 µm Durchmesser) und besitzt eine Oberfläche von 10 m²/g, die komplett mit einer einzelnen Phospholipidschicht bedeckt ist.

Zur spezifischen Elution wurde im Batchverfahren aktives Enzym (detergens- und nicht-detergenshaltig) auf das Transil[®]-Material gegeben und danach Temperatur- und Salzgradienten durchgeführt.

2.5.6 Aufreinigungsstrategie

Das Konzept der chromatographischen Aufreinigung ist in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.

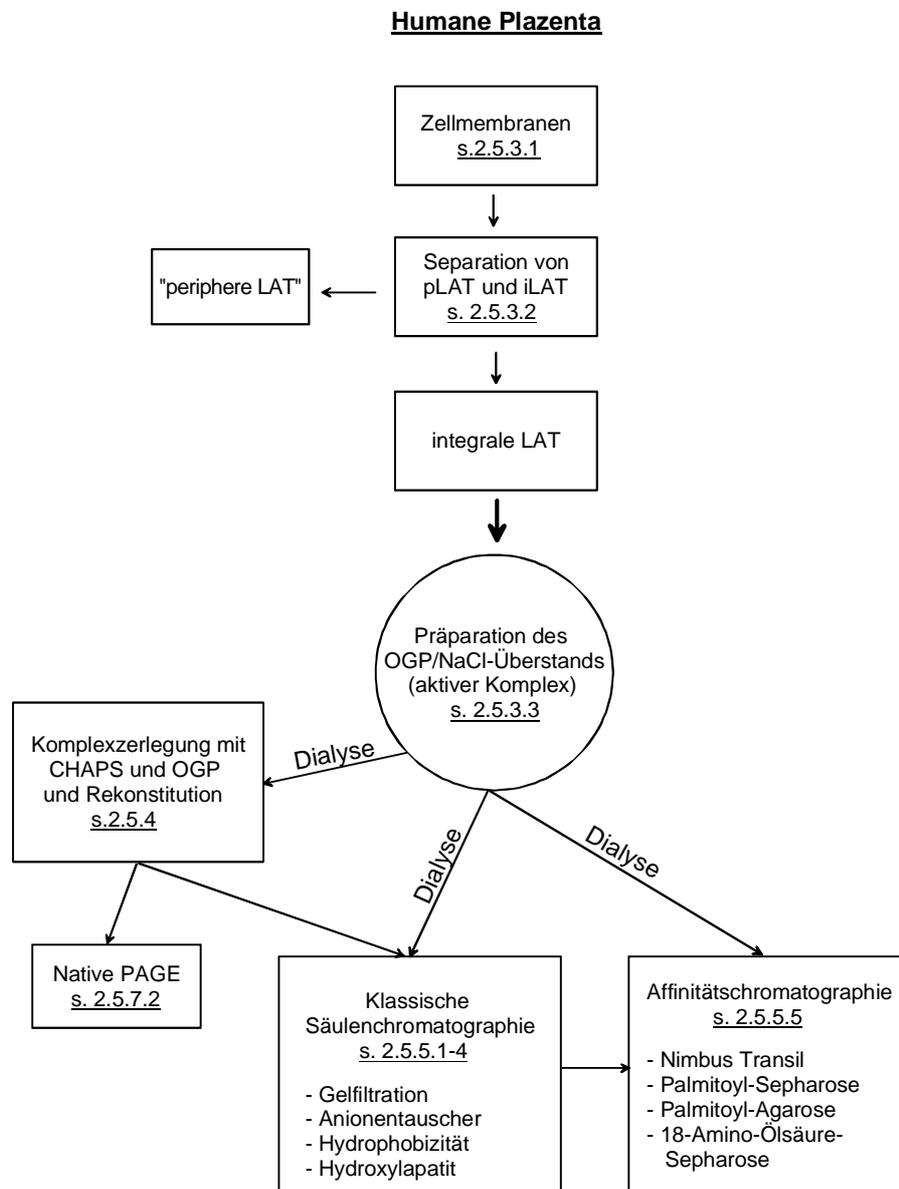


Abb.2.5.2: Strategie zur Reinigung der integralen LAT aus humaner Plazenta

2.5.7 Gelelektrophorese

2.5.7.1 SDS-Gele

Die SDS-PAGE ist eine elektrophoretische Methode zur Trennung von Polypeptiden aufgrund ihres Molekulargewichts. Hierbei werden Polyacrylamidgele verwendet, die das Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) enthalten. Die elektrische Ladung des Proteins ist in

Anwesenheit von SDS in dieser Elektrophoreseform nicht entscheidend, da SDS als anionisches Detergens die Proteine denaturiert, indem es diese komplett umlagert (1,4 g SDS/g Protein). Dem Protein wird dadurch eine negative Nettoladung aufgezwungen. Die Zugabe reduzierender Agentien wie DTT oder Mercaptoethanol führt darüberhinaus zu einer totalen Proteinentfaltung. Die einzelnen Systeme unterscheiden sich in den verwendeten Puffern.

2.5.7.1.1 Laemmli SDS-Gel

Das gebräuchlichste SDS-System ist das diskontinuierliche Tris-Glycin-System von Laemmli et al. (1970). Das Gel besteht dabei aus einer Kombination von Trenngel (Tris-Glycin pH 8.8; 7,5-20 % Acrylamid) und überschichtetem Sammelgel (Tris-Glycin pH 6.8; 5 % Acrylamid). Prinzip der Trennung ist dabei generell eine Separation der, durch SDS in eine „gestreckte Form“ mit negativer Nettoladung gebrachten, Proteine. An der Trenngeloberseite kommt es zu einer Proteinkonzentrierung.

Lösungen:

Molekulargewichtsstandard: (vorgefärbt; 6,5 – 200 kDa)

- Elektrophorese-Puffer: Tris (25 mM)/ Glycin (192 mM) pH 8.3-8.5
SDS (0,1 %; w/v)
- Auftrags-Puffer Tris (62,5 mM) pH 6.8
SDS 6 % (w/v)
Glycerin 30 % (w/v)
2-Mercaptoethanol 15 % (w/v)
Bromphenolblau 0,1 % (w/v)
- SDS 1 % (w/v) in H₂O
- Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) in H₂O
- TEMED
- Acrylamid (30,8 % T w/v; 3 % C w/v in H₂O)
- Tris 1,5 M pH 8.8
- Tris 0,5 M pH 6.8

Durchführung:

Das Acrylamidgel wurde entsprechend Tab.1 angesetzt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt (2:1; v/v) und 5 min auf 95°C erhitzt. Die Standards wurden nach Herstellerangaben behandelt und 5 µl auf eine Bahn aufgetragen.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12,5 %)
Tris (1,5 M) pH 8,8	-----	3,75ml	3,75 ml
Tris (0,5 M) pH 6,8	1,13 ml	-----	-----
Acrylamid (30,8% T (w/v), 3% C (w/w)) in H ₂ O	1,50 ml	5,00 ml	6,25 ml
SDS (1 %; w/v) in H ₂ O	0,90 ml	1,50 ml	1,50 ml
H ₂ O	5,48 ml	4,75 ml	3,50 ml
APS (10 %; w/v) in H ₂ O	96 µl	130 µl	130 µl
TEMED	24 µl	32,5 µl	32,5 µl

Tab.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel im Laemmli-System

Nach Probenapplikation wurde zur Konzentrierung der Proben im Sammelgel zuerst für 30 min eine Stromstärke von 20 mA/Gel angelegt. Danach verlief die restliche Elektrophorese bei 40 mA/Gel bis zum Farbaustritt an der Gelunterkante.

2.5.7.1.2 Schägger und Jagow-System

Für Sequenzierungszwecke wurde ein von *Schägger und Jagow (1987)* entwickeltes SDS-System verwendet. Dieses enthält kein Glycin wie das Laemmli-System, sondern Tricin. Außerdem gibt es keinen pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel. Die Vorzüge liegen in der besonderen Auftrennung kleiner Proteine (<10 kDa) und der geringeren Cl⁻-Ionenempfindlichkeit. Das Fehlen der Aminosäure Glycin erlaubt die Verwendung dieser Gele in der Mikrosequenzierung.

Lösungen:

- Anodenpuffer: Tris (0,2 M) pH 8.9
- Kathodenpuffer: Tris (0,1 M); Tricin (0,1 M) pH 8.15 – 8.25
SDS (0,1 %; w/v)
- Probenpuffer: DTT (1 M)
SDS (20 %; w/v)
Bromphenolblau (0,2 %; w/v)
- Glycerin

Durchführung:

Das Gel wurde entsprechend Tab.2 angesetzt. Es wurden für die Mikrosequenzierung ausschließlich 0,75mm Gele verwendet, um die Bandenschärfe zu erhöhen.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (8 %)
Gelpuffer: Tris (3 M) pH 8.45; SDS (0,3 % w/v)	3,8 ml	12,5 ml
Acrylamid: (49,5 % T (w/v), 3 % C (w/v) in H ₂ O)	1,2 ml	6,1 ml
Glycerin (50 % w/v) in H ₂ O	-----	10 ml
H ₂ O	10 ml	8,9 ml
APS (10 % w/v) in H ₂ O	80 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tab.2: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel des Schägger-Jagow-Systems

Alle Proben wurden mit 10 % (v/v) Probenpuffer und 10 % (v/v) Glycerin versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde zunächst bei 40 mA/Gel durchgeführt (Proteinkonzentrierung). Danach wurde die Stromstärke auf 80 mA/Gel erhöhet. Nach dem Austritt der Farbfront wurde die Elektrophorese gestoppt.

2.5.7.1.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF und 2D)

Die zweidimensionale Elektrophorese trennt Proteine nach ihrem isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht. Dadurch ist die Analyse komplexer Proteinlösungen möglich. Für die 2D-Elektrophorese wird das Protein in Harnstoff, einem Detergens und Mercaptoethanol gelöst. Für die verschiedenen Anwendungsbereiche müssen die Pufferbedingungen optimiert werden. So wurde hier zusätzlich Thioharnstoff eingesetzt, um die Proteinaggregation zu minimieren und die Solubilisierung und den Eintritt in das Gel bei der zweiten Dimension zu erleichtern. Die isoelektrischen Fokussierungen wurden weitgehend auf der IPGphor™ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Für die zweite Dimension wurden herkömmliche Gelapparaturen verwendet.

Lösungen:

- Lyse-Puffer I:
 - 8 M Harnstoff
 - 4 % (w/v) CHAPS
 - 40 mM Tris Base
 - in H₂O
- Lyse-Puffer II:
 - wie I aber zusätzlich 2 M Thioharnstoff

- Rehydrationslösung (Stock)
mit IPG-Puffer I: 8 M Harnstoff
2 % (w/v) CHAPS
0,5 % (v/v) IPG-Puffer (gleicher pH-Bereich wie IPG
Streifen)
Bromphenolblau (einige Körnchen)
in H₂O
- Rehydrationslösung (Stock)
- mit IPG-Puffer II: wie I aber mit 2 M Thioharnstoff
- SDS-Equilibrierungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8
6 M Harnstoff
30 % (v/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
Bromphenolblau (einige Körnchen)
in H₂O
- 1 M DTT

Durchführung:

I. Probenvorbereitung

Die jeweilige Proteinprobe wurde nach *Wessel & Flügge (1983)* präzipitiert und dann in 50 µl Lyse-Puffer gelöst. Dazu wurden 20 µl 1M DTT und 180 µl Rehydrationslösung gegeben (alternativ im Puffersystem mit oder ohne Thioharnstoff).

Das gelöste Protein wurde dann in die IPG-Streifenhalter gefüllt und ein 13 cm IPG-Streifen (pH 3-10) luftblasenfrei aufgelegt. Um ein Verdunsten oder das Auskristallisieren von Harnstoff zu verhindern, wurde mit 300 µl Mineralöl überschichtet.

II. Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit immobilisiertem pH Gradient (IPG)

Nach Verschließen des IPG-Streifenhalters wurde der Halter auf der IPGphor™ plaziert und das IEF-Programm gestartet:

Schritt	Volt	Dauer
Rehydrierung	-	2 h
Schritt 1	50	10 h
Schritt 2	500	1 h
Schritt 3	2000	1 h
Schritt 4	8000	2 h
Schritt 5	500	10 h

Tab.3: Programmierung der IPGphor™

Am Ende der IEF wurde der IPG-Streifen in einem Glasröhrchen mit 5 ml SDS-Äquilibrationpuffer und 50 µl DTT versetzt und horizontal für 15 min bei RT äquilibriert.

III. Zweite Dimension SDS-PAGE

Nach der Äquilibration wurde der IPG-Streifen auf ein 20x20 cm 10 % SDS-Gel mit der Plastikseite zur Glasfläche passgenau auf das Gel gelegt und der Standard daneben appliziert. Der Lauf erfolgte bei 40 mA/Gel. Anschließend wurde das Gel silbergefärbt.

2.5.7.2 Native PAGE

Native Gelsysteme enthalten kein SDS, die Ladung der Proteine im Gel richtet sich daher nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH des verwendeten Puffers. Ein Vorteil dieser Methode ist die mögliche Erhaltung der biologischen Aktivität des Proteins und die Möglichkeit, diese aus dem Gel zu eluieren sowie biologische Enzymassays im Gel durchzuführen. Problematisch zeigt sich dagegen der große Zeitaufwand des Elektrophoreselaufs und das sogenannte „Schmier“ von Membranproteinen im Gel (*Schägger et al., 1991*).

Lösungen:

- Elektrophorese-Puffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8.8
- Acrylamid, Tris-HCl-Puffer und APS wie unter Lamkli-System

Durchführung:

1,5 mm 4 % Acrylamidgele wurden entsprechend Tabelle 4 hergestellt.

30% Acrylamid	2ml
Glycerin	3g
1,5M Tris-HCl	0,5ml
Bidest.	9,5ml
Temed	15 μ l
40% APS	15ml

Tab.4: Native PAGE-Gelzusammensetzung

Auf ein Sammelgel wurde hier verzichtet. Die durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierten Proteinproben wurden mit verschiedenen Detergenskonzentrationen und wahlweise mit oder ohne Photoaffinitätsmarker vorinkubiert und die Elektrophorese bei 4°C und 100 V (Vorlauf 30 min) bzw. 150 V (mit Probe) durchgeführt.

Zur Aktivitätsmessung im Gel wurde jede Bahn in 6x1 cm Fragmente zerschnitten und jedes Gelstück mit 100 μ l LAT-Assay-Puffer 30 min bei 4°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μ l Substratlösung (s. LAT-Assay) und Inkubation bei 37°C für 30 min. Das weitere Verfahren entsprach dem des radioaktiven LAT-Standard-Assays.

2.5.8 Färbung und Trocknung der Gele

Bei Verwendung des Laemmli-Systems wurden die Gele im Anschluß an die Elektrophorese gefärbt und getrocknet. Als Färbemethode kamen die Färbung mit kolloidalem Coomassie oder mit Silber zum Einsatz.

2.5.8.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie oder GelCode[®]

Zur Coomassiefärbung wurde hier ein Kolloid der Fa. Roth benutzt. Dieses zeichnete sich durch hohe Sensitivität und eine geringe Hintergrundanfärbung aus.

Lösungen:

- Fixierlösung: MeOH (20 %; v/v); H₃PO₄ (1 %; v/v)
- Färbelösung: MeOH (20 %; v/v); Roti[®]-Blue (1x)
- Waschlösung: MeOH (25 %; v/v)

Durchführung:

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 60 min in der Fixierlösung inkubiert, im Anschluß daran über Nacht in der Färbelösung geschwenkt und dann in der Waschlösung für mindestens 5 min gewaschen.

Alternativ und zeitsparend wurde das Fertigprodukt GelCode[®]Blue Stain Reagent der Fa. Pierce eingesetzt.

Überzeugend sensitiv war dieses Produkt lediglich nach Einwirkung über Nacht. Aufwendige Waschschriffe entfallen allerdings.

Lösung:

- GelCode[®]-Fertiglösung

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel 3x 5 min mit Bidest gewaschen. Im Anschluß daran wurde die GelCode[®]Fertiglösung auf das Gel gegeben. Nach erfolgter Färbung wurde vor der Trocknung nochmals mit H₂O gewaschen.

2.5.8.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung kam eine Methode nach *Blum et. al. (1987)* zum Einsatz. Bei der Silberfärbung bindet das Ag⁺-Ion an die Glu-, Asp- und Cys-Reste der Proteine. Thiosulfat reduziert das Ag⁺ der Komplexe zu elementarem Silber.

Lösungen:

- Fixierlösung: MeOH (50 %; v/v); HAc (12 %; v/v); Formaldehyd (0,1 %; v/v)
- Färbelösung: AgNO₃ (2 mg/ml); Formaldehyd (0,075 %; v/v)
- Entwickler: Na₂S₂O₃ x 5H₂O (4 mg/ml); NaCO₃ (60 mg/ml); Formaldehyd (0,05 %; v/v)
- Stopplösung: MeOH (25 %; v/v); HAc (12,5 %; v/v)

Durchführung:

Nach Fixierung über Nacht wurde das Gel mit folgenden Lösungen für die angegebene Zeit gewaschen: Methanol (40 %; v/v) 3 x 20 min; Methanol (25 %; v/v) 20 min; Na₂S₂O₃ (0,02 %; w/v); 1 min; H₂O 3 x 20 sec; Färbelösung 30 min; H₂O 3 x 20 sec; Entwickler nach gewünschter Intensität; H₂O 2 x 2 min; Stopplösung mindestens 10 min.

2.5.8.3 Trocknung der Gele

Lösungen:

- Trocknungslösung (auch kommerziell erhältlich): Ethanol (20 %; v/v); Glycerol (5%; w/v)

Durchführung:

Das Gel wurde nach mehrmaligem Waschen in Wasser in der Geltrocknungslösung äquilibriert und zwischen zwei ebenfalls in der Trocknungslösung eingeweichten Cellophanblättern in einen Trocknungsrahmen eingespannt und bei RT getrocknet. Die Trocknungszeit lag zwischen 24 und 48 Stunden.

2.5.9 Western-Blotting

Unter Western-Blotting versteht man den elektrophoretischen Transfer negativ geladener SDS-Protein-Komplexe auf eine Membran. Die proteinbeladene Membran kann mittels spezifischer Nachweismethoden zur Untersuchung der transferierten Proteine dienen. Außerdem eignen sie sich für die direkte Mikrosequenzierung der auf der Membran fixierten Proteine (*Matsuidaira et al., 1987*). Deshalb wurden die in Schägger-Jagow-Gelen (vgl. Kapitel 2.5.7.1.2.) aufgetrennten Proteine im Anschluß an die Elektrophorese mittels der horizontalen „Semi-Dry-Blot“- Methode bzw. über das Naßblotting-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.5.9.1 Semi-Dry-Blotting

Lösungen:

- Puffer A: MeOH (20 %; v/v); Tris (0,3 M) pH 10.4 (nicht eingestellt)
- Puffer B: MeOH (20 %; v/v); Tris (25 mM) pH 10.4 (nicht eingestellt)
- Puffer C: MeOH (20 %; v/v); Tris (25 mM); pH 9.0 (mit Borsäure eingestellt)

Durchführung:

Je 2 auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere (Schleicher & Schuell) wurden in Puffer A, B bzw. C getränkt. Die Transfermembran (PVDF, Immobilon[®] PSQ) in Gelgröße wurden zuerst 10 min in Methanol und dann für weitere 10 min in Puffer B äquilibriert. Das Gel wurde wenige Minuten in Puffer C äquilibriert.

Die Blottingapparatur mit den Filterpapieren, der Blotmembran und dem Trenngel zwischen den Elektroden wurde wie folgt aufgebaut:

Kathodenplatte

2 Lagen Filterpapier, Puffer C

Trenngel

Blotmembran

2 Lagen Filterpapier, Puffer B

2 Lagen Filterpapier, Puffer A

Anodenplatte

Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von 30 min bei einer Stromstärke von $2,5 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche.

2.5.9.2 Naßblotting

Das Naßblotten eignet sich im Vergleich zum Semi-Dry-Verfahren besonders gut für den Transfer von Proteinen höheren Molekulargewichts ($> 100 \text{ kDa}$). Die Transfereffizienz kann dabei durch den Gehalt an Methanol gesteuert werden.

Lösungen:

- Blotpuffer: 25 mM Tris-Base pH 8.3
191 mM Glycin
10 % (v/v) Methanol
in H_2O
- MeOH p.a.

Durchführung:

Nach der Gelelektrophorese wurde die Blotapparatur entsprechend der nachfolgenden Abbildung zusammengebaut. Hierzu wurde der Behälter zunächst mit Blotpuffer befüllt und die Schwämme in selbigem von Luftblasen befreit. Die PVDF-Blotmembran wurde für einige Sekunden in MeOH und danach wie das Gel ebenfalls für 2 min in Blotpuffer äquilibriert. Nach Verschließen des Blottanks mit einer Abdeckung wurde dieser vertikal aufgerichtet, der Pufferstand kontrolliert und eine Spannung von 24 V für 40 min angelegt. Danach konnte eine Färbung oder ECL-Reaktion auf der Membran angeschlossen werden.

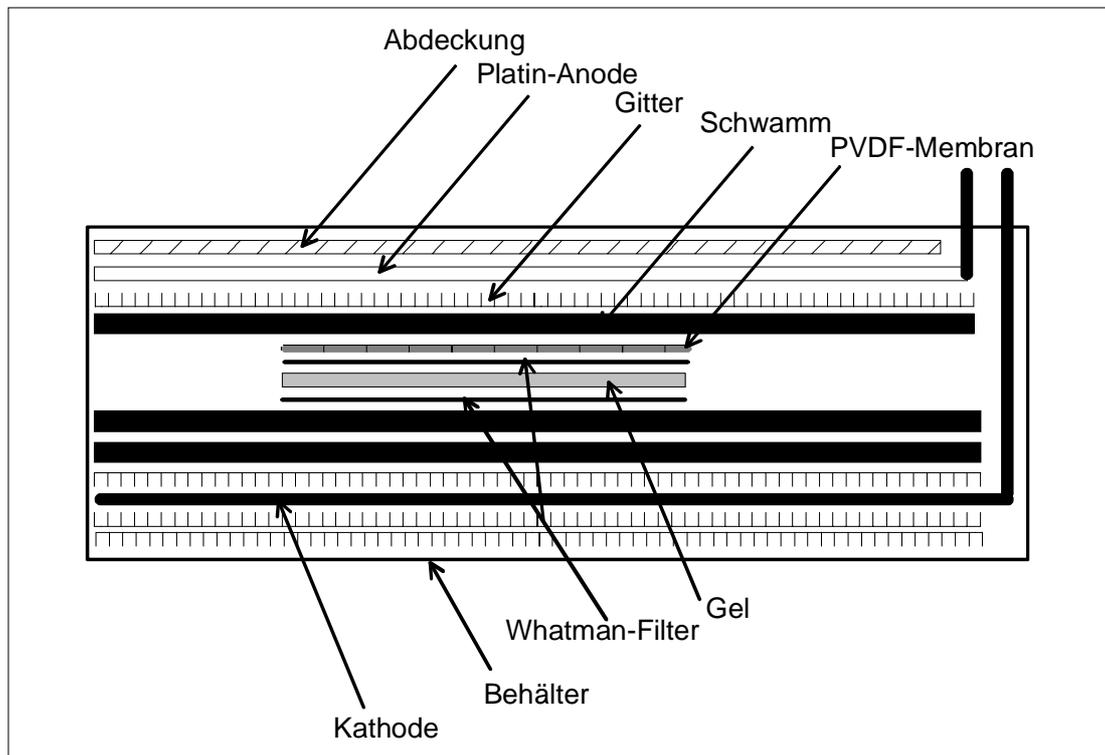


Abb.2.5.3: Aufbau der Naßblottingapparatur

2.5.9.3 Färbung der Membran

Ein direkter Proteinnachweis erfolgte mittels Coomassiefärbung auf der Membran ohne die anschließende Mikrosequenzierung negativ zu beeinflussen (*Xu et al., 1988*).

Lösungen:

- Entfärber: MeOH (50 %; v/v)
- Färbelösung: MeOH (40 %; v/v); HAc (0,25 %; v/v); Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,025 %; w/v)

Durchführung:

Die PVDF-Membran wurde 90 sec in der Färbelösung geschwenkt und für 3x 30 sec entfärbt. Es folgte ein Waschgang in Wasser für mehrere Stunden bevor die Membran auf einer Glasplatte getrocknet wurde. Anschließend wurde das gesuchte Protein ausgeschnitten und partiell mikrosequenziert.

2.6 Immunologische Methoden

Das Yamanouchi Research Institute, Oxford, UK, hatte sich, im Rahmen einer Kooperation bereit erklärt, einen von ihnen hergestellten Antikörper gegen CoA abhängige Acyltransferasen für immunologische Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Dieses

Experimente wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Yamanouchi Research Institute in Oxford, UK, durchgeführt.

2.6.1 ECL-Reaktion

Geblottete Antigene lassen sich mit spezifischen Antikörpern anfärben. Der geblockte Blot wird zuerst mit anti-Antigen-Antikörpern (1. Antikörper) inkubiert. Danach wird ungebundener anti-Antigen-Antikörper gewaschen und der Blot mit dem, in diesem Fall, Peroxidase-markierten Antikörper (2. Antikörper) inkubiert. Dieser bindet an den anti-Antigen-Antikörper. Nach weiterem Waschen wird der Blot mit Hilfe der Markierung des 2. Antikörpers entwickelt und damit die Position des Antigens sichtbar. Bei der ECL-Reaktion handelt es sich um eine Chemilumineszenz-Reaktion durch die Oxidation von Luminol. Der Nachweis erfolgte mittels Autoradiographiefilm.

Lösungen:

- Blockpuffer: 5 % (w/v) Magermilchpulver
PBS
0,05 % Tween
0,1 % (v/v) Ziegen Serum
- Primärer Antikörper: Kaninchen-anti-CoA-abhängige Acyltransferase Antikörper
- Sekundärer Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Konjugat Antikörper
- ECL-Detektionskit: Lösung 1 und 2 (Fa. Amersham Life Science, UK)
- Detektionslösung: Lösung 1 + 2 (1:1, v/v)
- Stripping-Puffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol
2 % (w/v) SDS
62,5 mM Tris-HCl
- PBS + 0,05 % (v/v) Tween

Durchführung:

Nach dem Blotten des Proteins auf die PVDF-Membran wurde diese mit 10 ml Blockpuffer für 1 h bei RT und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde dann 1x 5min mit PBS/Tween gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS/Tween für 1 h bei RT. Danach erfolgten drei Waschschrte mit je 10 ml PBS/Tween und im Anschluß die einstündige Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper. Nach vier weiteren Waschschrten (1x 15min, 3x 5min) mit PBS/Tween wurde die Membran mit 10 ml Detektionslösung bedeckt und für eine Minute bei RT inkubiert. Die Lösung wurde darauffolgend komplett entfernt (kein Trocknen der Membran!) und die Membran in Haushaltsfolie eingewickelt, wobei Luftblasen zu vermeiden waren. Die Expositionszeit des aufgelegten Films betrug 5 bis 30 min.

2.6.1.1 Wiederverwendung von Blotmembranen

Für eine erneute ECL-Detektion können vorherige Antikörper entfernt und die Membran mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

Lösungen:

- „Entfärbungspuffer“: 100 mM 2-Mercaptoethanol
2 % (w/v) SDS
62,5 mM Tris-HCl
- PBS/0,05 % (v/v) Tween
- Blockpuffer: 5 % (w/v) Magermilchpulver
PBS/0,05 % Tween
0,1 % (v/v) Ziegen Serum

Durchführung:

Die Antikörper vorheriger Detektionen wurden durch eine Inkubation mit dem „Entfärbungspuffer“ bei 50°C für 30 min unter Schütteln entfernt. Danach wurde 2x 10 min mit PBS/Tween bei RT inkubiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit dem Blockpuffer.

Die Immundetektion konnte dann, wie unter ECL-Reaktion beschrieben, mit dem primären Antikörper fortgesetzt werden.

2.6.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Technik zur Erkennung eines Antigens unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Mit einem Zweitantikörper (in der Regel IgG oder IgA) der z. B. an Agarose gekoppelt ist, läßt sich der Antigen-Antikörperkomplex aus einer Lösung entfernen. Diese Präzipitationsanalyse gibt Aufschluß über die Spezifität eines generierten Antikörpers. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Vergleich des Präimmuserums mit dem Immuserum.

Lösungen:

- LAT-Assay-Puffer
- Präimmuserum (0,65 mg/ml)
- Immuserum (2,4 mg/ml Kaninchen-anti-CoA-abhängige Acyltransferase Antikörper)
- Zweit-Antikörper: Anti-Kaninchen IgG-Antikörper
- Protein A

Durchführung:

2µg enzymatisch aktiver OGP/NaCl-Überstand (ÜS_{2dia}) wurden mit dem Prä- oder Immunsersum (Konzentration final: 0,024 – 0,000375 mg/ml) in einem 100 µl Ansatz für 4 h bei 4°C inkubiert.

Dann wurden als Zweitantikörper entweder 20 µl Anti-Kaninchen IgG-Antikörper oder 20 µl Protein A zugegeben und erneut bei 4°C für 2 h inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14.000 xg für 2 min und 4°C wurde die LAT-Aktivität im Überstand sowie die des Pellets gemessen.

2.7 Mikrosequenzierung

Die Sequenzierung von Kandidatenproteinen wurde in Kooperation mit Dr. H.H. Thole aus der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover und Dr. M. Schnölzer aus der Zentralen Proteinanalytik am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt.

Die Proteine wurden für die Sequenzierung auf einem Schägger & Jagow-Gel (s. 2.5.7.1.2) getrennt und dann über Western-Blotting (s. 2.5.9.1) bzw. Naßblotting (s. 2.5.9.2) auf eine PVDF-Membran transferiert. Wenn der Proteintransfer sehr schlecht war, konnte alternativ auch direkt aus dem Laemmli-SDS-Gel sequenziert werden. Hierzu wurde das Gelstück mit dem zu analysierenden Protein mittels Trypsin verdaut und dann mittels MALDI-TOF untersucht.

2.7.1 Proteolytischer Verdau und Trennung der Fragmente

Ist das zu sequenzierende Protein N-terminal blockiert, so muß es vor der Mikrosequenzierung durch spezifische Endoproteasen verdaut und die Fragmente anschließend chromatographisch getrennt werden (*Bauw et al., 1989*). Diese Fragmente sind anschließend einer Mikrosequenzierung zugänglich. Zur Anwendung kam hier die Protease Lys-C. Sie spaltet spezifisch am carboxyterminalen Ende von Lysinresten.

Lösungen:

- Polyvinylpyrrolidon (PVP) (0,25 %; w/v) in MeOH
- Protease-Puffer: Tris (0,1 M) pH 9,0; 1 mM EDTA; reduziertes Triton X-100 (0,02 %; v/v)
- Ameisensäure (80 %, v/v)
- Laufmittel A: TFA (0,1 %; v/v) in H₂O
- Laufmittel B: TFA (0,085 %; v/v) in Acetonitril (60 %; v/v)

Durchführung:

Die Transfermembran mit dem Zielprotein wurde in kleine Stücke geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl PVP-Lösung 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe

von 500 µl H₂O folgte eine weitere Inkubation für 5-10 min. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation (12.000 xg; 3 min) verworfen und die Membranstücke nacheinander 5x mit H₂O gewaschen. In 100 µl Protease-Puffer und 5 U Lys-C wurden die Membranstücke über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Überstand wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt, die Membranstücke 1 x mit 100 µl Ameisensäure (80 %; v/v) und 4 x mit 100 µl H₂O gewaschen. Alle Waschlösungen wurden zu dem Überstand gegeben und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Um die Proteinfragmente zu trennen, wurde eine HPLC-Säule (Brownlee Aquapore RP C-8/300; HPLC-Anlage: Applied Biosystems) verwendet. Nach Applikation der Probe wurde bei einer Flußrate von 0,4 ml/min nach einer isokratischen Elution (2,4 ml) ein linearer Gradient von 0 % B (100 % A) – 100 % B (0% A) bei einer RT innerhalb von 90 min durch die Säule gepumpt. Die Analyse des Eluats erfolgte mit einem Durchflußphotometer bei 215 nm. Die Fraktionierung der Peaks erfolgte manuell nach Photometeranzeige und Schreiberzeichnung. Bis zur Analyse wurden die gesammelten Fraktionen (50-200 µl) bei -20°C gelagert.

2.7.1.1 Trypsin-Spaltung im Gel

Zur Analyse schlecht oder nichtblotbarer Proteine wurden die entsprechenden Gelfragmente mit Trypsin verdaut.

Lösungen:

- Acetonitril
- Trypsin-Lösung (20 µg Trypsin in 40 µl 1mM HCl)
- NH₄HCO₃-Puffer (32 mg/10 ml)

Durchführung:

Mit Coomassie gefärbte Gelstücke wurden unter Vermeidung von Kontaminationen in ein 200 µl PCR-Röhrchen überführt und 2 x mit 100 µl H₂O für 30 min gewaschen. Anschließend wurde 2x mit 100 µl von einem Gemisch H₂O /Acetonitril (1:1, v/v) für 15 min gewaschen. Eine Lagerung der Gelstücke kann in dieser Lösung erfolgen. In 100 µl Acetonitril wurden die Gelfragmente dann dehydratisiert (Gele schrumpften und wurden heiß). Nach Abnahme des Lösungsmittels wurde die Probe an der Luft für 5min getrocknet und danach mit 0,8 µl Trypsin-Lösung und 20 µl frischem NH₄HCO₃-Puffer versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C sind die Gelstücke gequollen. Vor der Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Probe ausreichend mit NH₄HCO₃-Puffer bedeckt. Für die MALDI-Analyse wurden 0,5 µl Überstand entnommen. Der Rest wurde bei -20°C eingefroren.

2.7.2 Sequenzbestimmung über einen Sequenzer

Die Mikrosequenzierung konnte entweder ausgehend von der ausgeschnittenen PVDF-Membran mit dem zu untersuchenden Protein oder von den Fraktionen der HPLC-Trennung der Proteinfragmente durchgeführt werden. Sie erfolgte an einem automatischen Sequenzer der Fa. Applied Biosystems.

Dieser Sequenzer führt in einem automatisierten Zyklus den Edman-Abbau durch. Dabei reagiert Phenylisothiocyanat (PITC) mit terminalen Aminogruppen von Proteinen unter milden alkalischen Bedingungen unter Bildung von Phenylthiocarbamoyl-Addukten. Die Behandlung mit wasserfreier Flußsäure spaltet den N-terminalen Rest selektiv als Thiazolin-Derivat ab, ohne daß dabei andere Peptidbindungen hydrolysiert werden. Die Thiazolin-Aminosäure wird selektiv mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und durch Behandlung mit wässriger Säure in das stabilere PTH (Phenylthiohydanthoin-)-Derivat überführt. Während das um die eine Aminosäure verkürzte Protein wiederum mit PITC reagiert, wird die PTH-Aminosäure vollautomatisch mittels eines HPLC-Säulenlaufes über seine Retentionszeit identifiziert.

2.7.3 Sequenzbestimmung über MALDI-TOF

Zur Untersuchung von Trypsin-verdauten Proteinen wurde hier die MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit einem Reflex II time-of-flight Detektor (Bruker-Daltronik GmbH) eingesetzt. Die Spektren wurden mittels der Autolyseprodukte des Trypsins (m/z 842,50 und m/z 2211,10) kalibriert.

Die mit der MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Molekülmassen wurden zur Datenbankrecherche in entsprechenden Suchprogrammen (MS-Fit, University of San Francisco; Profound, Rockefeller University; und Peptide Search, EMBL) eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Zelluläre Bedeutung der LAT

Neben einer Vielzahl von anderen zellulären Funktionen scheint der LAT auch im Rahmen der Zellproliferationskontrolle eine Bedeutung zuzukommen. Um diese Rolle der LAT im Lipidstoffwechsel von T-Lymphozyten zu analysieren, wurden hier T-Zelltumorzelllinien mit T-Zellen von Normalspendern verglichen. Die Tumorzelllinien wurden von Herrn. PD Schrappe aus der hämatologischen Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Einbau von Linolsäure

Es wurde vergleichend der Einbau von ^{14}C -Linolsäure in unterschiedliche Zellpopulationen betrachtet. Die Kontrollgruppe bestand aus reinen T-Zellen (E^+), die über das Rosettierungsverfahren in 2.2.1 hergestellt wurden. Diese T-Zellen wurden mit PHA in einen aktivierten Zustand überführt und stellten eine zweite Zellpopulation dar. Des weiteren wurden zwei Zelllinien von Patienten mit akuter T-Zelleukämie und die Tumorzelllinie CEM von ATCC untersucht.

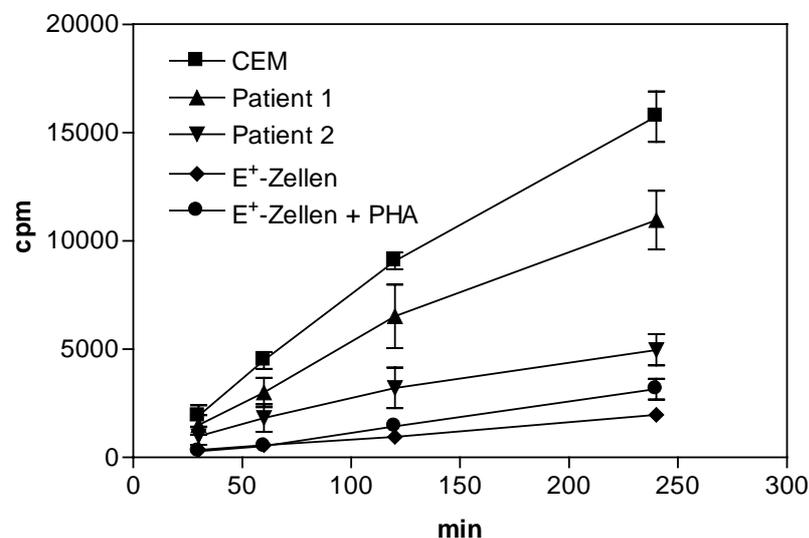


Abb. 3.1.1: Vergleich verschiedener T-Zellpopulationen hinsichtlich ihres Linolsäureeinbaus

$1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit $0,36 \mu\text{Ci/Ansatz}$ ($1 \mu\text{M}$) ^{14}C -Linolsäuresubstratlösung für verschiedene Zeiten inkubiert. Eine Zellpopulation wurde dabei über den Zeitraum des Einbaus mit $5 \mu\text{g/ml}$ PHA stimuliert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD aus zwei Versuchen mit Dreifach-Werten.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Population der Normalspender (E^+ -Zellen) mit PHA sowohl stimuliert als auch unstimuliert Linolsäure in geringem Maße einbauen. Dieser Effekt ist nach 4 h am deutlichsten. Die Tumorzelllinie CEM inkorporiert im Vergleich zu den E^+ -Zellen nach 4 h das 10-fache der Linolsäure. Im Vergleich zu reinen T-Zellen war der Einbau

bei der Patientenzelllinie 2-3-fach höher. Die Patientenzelllinie 1 zeigte einen ca. 8-fach erhöhten Einbau von Linolsäure im Vergleich zu den E⁺-Zellen.

3.1.2 Messung der LAT-Aktivität in Homogenaten

Um eine Aussage über die Aktivität der LAT in den einzelnen Zellpopulationen zu erhalten, wurden Messungen im Gesamthomogenat durchgeführt.

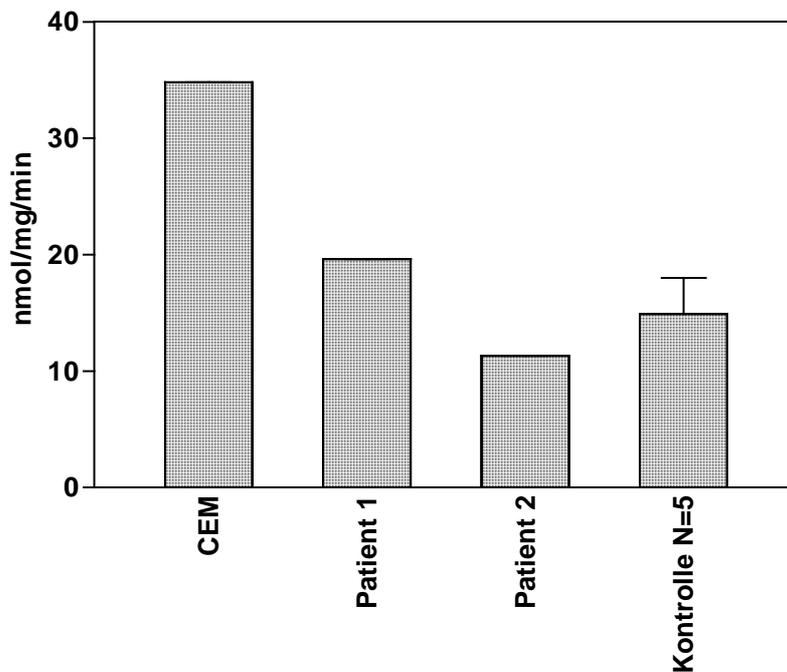


Abb.3.1.2: Vergleich der LAT-Aktivitäten in Zellhomogenaten

Zellhomogenate der Zellpopulationen CEM, Patient 1, Patient 2 und einer Kontrolle (E⁺-Zellen von fünf verschiedenen Spendern, gezeigt ist der Mittelwert \pm SD) wurden im LAT-Assay untersucht.

Das Ergebnis zeigt für die Zelllinie von Patient 2 einen höheren Linolsäureeinbau aber eine den E⁺-Zellen vergleichbare LAT-Aktivität. Die Zelllinie CEM zeigt eine 2,3-fach höhere spezifische Aktivität, während die spezifische Aktivität der Zelllinie Patient 1 leicht erhöht ist.

3.2 Biochemische Schritte zur Aufreinigung der LAT

Der Weg zur Aufreinigung eines Proteins wird heutzutage mit molekularbiologischen oder aber „klassisch“ biochemischen Verfahren bestritten. Letztere wurden hier überwiegend verwendet, zumal sie effektive Methoden darstellen können.

3.2.1 Vorfraktionierung der enzymatischen Aktivität

Die Präparation der LAT-Aktivität aus 300 g humanem Plazentagewebe führte zunächst zu einer groben Membranfraktion, auch als Crude Membranen (CM) bezeichnet (vgl. Kapitel

2.5.3.1). Diese ist Ausgangspunkt der weiteren Aufreinigung gewesen (s. 2.5.3.2). Durch Behandlung mit 1 M NaCl ohne Detergens konnte in unserer Arbeitsgruppe eine lösliche LAT-Aktivität (periphere LAT; pLAT) abgetrennt werden (Kerkhoff *et al*, 1996). Diese Fraktion war bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen, da sie eine vermeintlich einfach zu isolierende Quelle des Zielproteins darstellte. Das resultierende Pellet 1 (P₁) wurde zur weiteren Aufreinigung eingesetzt. Die membranständige LAT-Aktivität wurde als integral vermutet und daher als iLAT bezeichnet. Aufgrund der höheren Aktivität des membranständigen LAT-Anteils wurde in dieser Arbeit der Reinigungsschwerpunkt auf diesen verlagert.

Hiermit wurde der Einsatz von Detergentien unerlässlich, und nach längerer Optimierung kristallisierten sich das zwitterionische CHAPS und das nichtionische n-Octylglucopyranosid (OGP) zur Solubilisierung der LAT unter Erhalt der Aktivität heraus.

Das Sediment P₁ wurde im ersten Solubilisierungsschritt mit 0,75 % (w/v) CHAPS versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 100.000 xg und 4°C für 60 min resultierte ein hochaktiver gelöster CHAPS-Überstand (CHAPS-ÜS) mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 876 nmol/mg/min. Die Lagerung bei -20°C war aufgrund der geringen Enzymstabilität nur über kurze Zeit möglich. Das verbliebene Pellet P₂ hatte nach wie vor eine spezifische Aktivität von 70 nmol/mg/min und war Gegenstand der weiteren LAT-Isolation.

Die kritisch mizellare Konzentration (engl. critical micellar concentration; CMC) kann durch die Kombination von Detergens und Hochsals herabgesetzt werden. Der CMC-Wert erfolgt durch die Messung der DPH-Fluoreszenz. Diese steigt deutlich bei der Inkorporation des Farbstoffs in Mizellen.

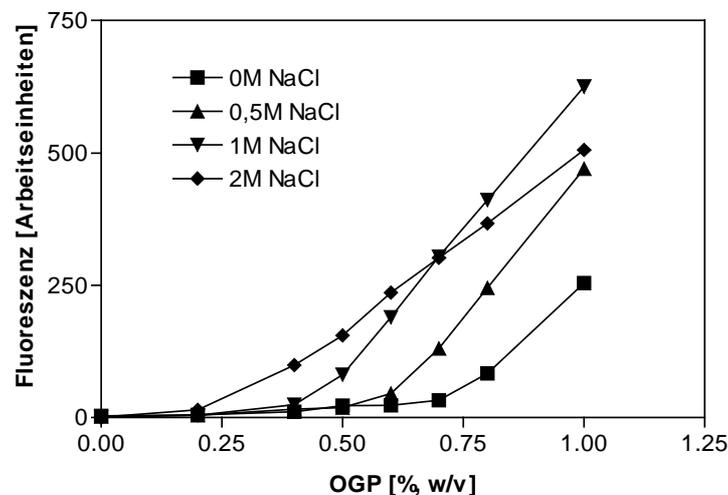


Abb.3.2.1: Bestimmung des CMC für OGP

In einem 1 ml Ansatz wurden 0-1 % (w/v) OGP mit 0-2M NaCl in H₂O versetzt, bei RT 30 min inkubiert und dann die DPH-Fluoreszenz im Vergleich zu einer Kontrolle mit H₂O gemessen.

Die Konzentration des OGP am CMC konnte der Abb. 3.2.1 entnommen werden. Mit steigender NaCl-Konzentration wurde die notwendige OGP-Konzentration zum Erreichen des CMC gesenkt. Ohne NaCl wurde eine CMC von 24,5 mM gemessen, während dieser Wert mit 0,5 M und 1 M NaCl auf 21,1 mM und 14 mM sank. Bei 2 M NaCl gab es vermutlich Löslichkeitsprobleme mit dem in THF gelösten DHP.

Dies führte zur Entwicklung eines zweistufigen Extraktionsverfahrens. P₂-Membranen wurden zunächst mit 0,75 % (w/v) OGP für 60 min bei 4°C inkubiert und dann 60 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der verworfene ÜS₁* enthielt Protein mit minimaler LAT-Aktivität (3 nmol/mg/min) und das entstandene Pellet P₁* wurde nochmals mit 0,75 % (w/v) OGP in Kombination mit 2 M NaCl für 60 min bei 4°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 60 min bei 100.000 xg und 4°C zeigte sich der OGP/NaCl-Überstand (ÜS_{2dia}) nach Dialyse als sehr aktiv mit bis zu 600 nmol/mg/min. Zugleich konnte der OGP/NaCl-Überstand über Monate bei -20°C gelagert werden. Das verbleibende Sediment (P₂*) wurde nicht nachextrahiert.

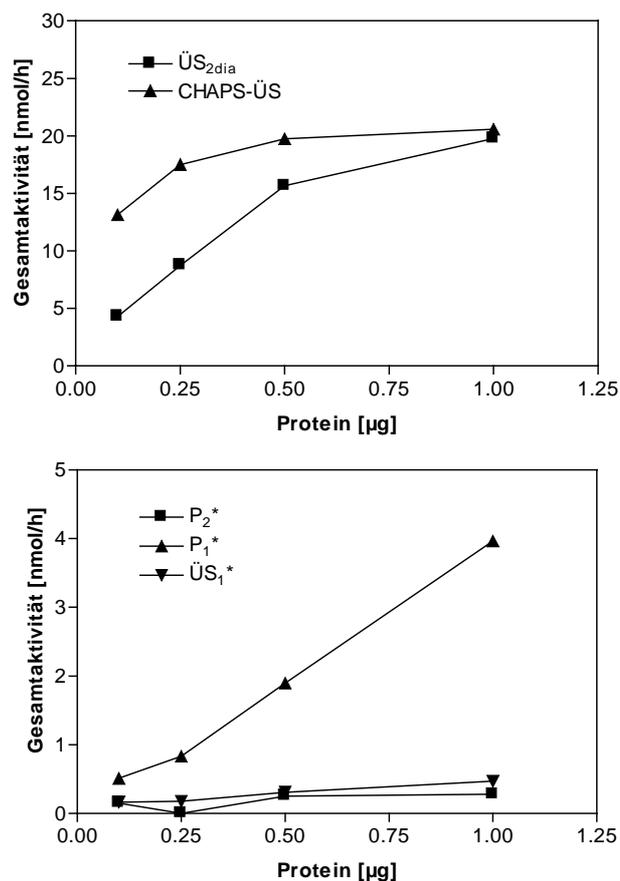


Abb. 3.2.2: Vergleich der Gesamtaktivitäten der LAT in unterschiedlichen Fraktionen

Die LAT-Aktivitäten der verschiedenen Präparationsstufen wurde im radioaktiven LAT-Assay gemessen. Variierende Proteinkonzentrationen wurden bei 37°C für 15 min mit der Substratlösung inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Ergebnissen.

Die nachfolgenden Experimente wurden zum Großteil mit den aktiven Überständen CHAPS-ÜS und OGP/NaCl-Überstand durchgeführt. Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt die Abb.3.2.2. Aus der Abb. 3.2.3 ist die gelelektrophoretische Auftrennung einzelner Fraktionen dieser Präparation zu erkennen.

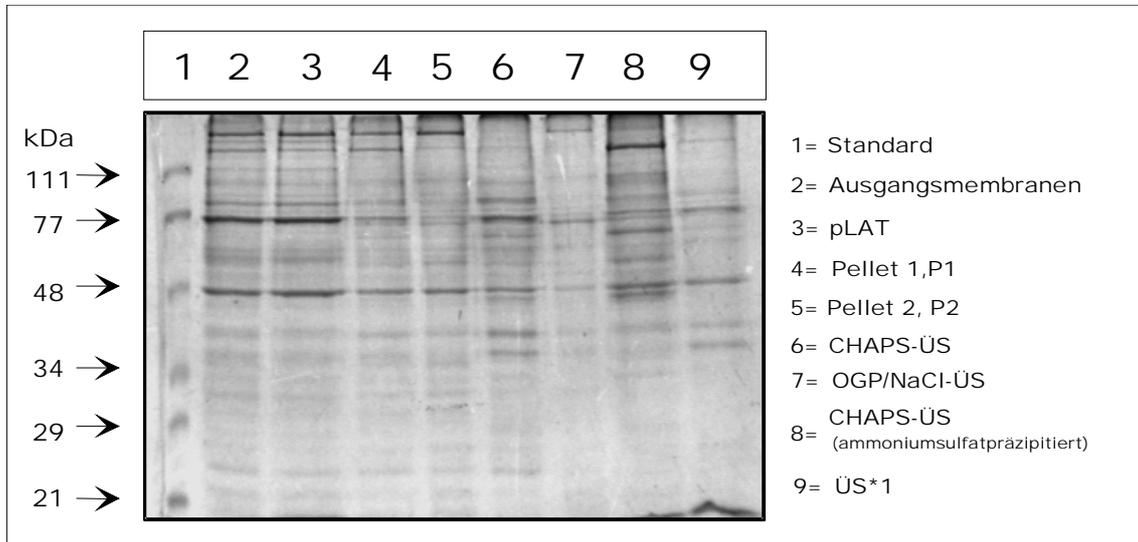


Abb.3.2.3: Gelelektrophoretische Trennung der einzelnen Präparationsfraktionen

5 µl Standard (1) und jeweils 15 µg CM (2), pLAT (3), P1 (4), P2 (5), CHAPS-ÜS (6), OGP/NaCl-ÜS (7), CHAPS-ÜS nach Ammoniumsulfatfällung (8) und ÜS1* (9) wurden aufgetragen.

3.2.1.1 LAT-Aktivität in Erythrozyten-Membranen

Aus Erythrozyten ist eine unter Hochsals extrahierbare Protein-palmitoyl Acyltransferase (PAT) bekannt (*Das et al., 1997*). Aus diesem Grund wurde das Fraktionierungsschema der LAT-Aktivität aus Plazenta auch auf Erythrozyten angewendet.

Die Präparationsstufen sind dabei weitgehend identisch zur Präparation des OGP/NaCl-Überstandes gewesen. Die Solubilisierung des Überstandes wurde optimiert. In einem Schritt wurde dieser mit 1 M NaCl und 1:10 OGP extrahiert.

Fraktion	Gesamtaktivität
Ausgangsmembranen	1,9
pLAT	0,2
Pellet 1 (P ₁)	4,5
CHAPS-ÜS	1,3
Pellet 2 (P ₂)	5,3
OGP/NaCl-ÜS	0,4

Tab.5: Aktivität der Erythrozyten-Fractionen

Insgesamt 5 µg Protein wurden im LAT-Assay auf Enzymaktivität getestet. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Ergebnissen.

Die Tabelle 5 macht deutlich, daß es nicht möglich war, den Hauptteil der Aktivität mit Hochsalz zu extrahieren. Die weitere Solubilisierung mit Detergentien konnte nicht unter Erhalt der LAT-Aktivität durchgeführt werden. Die Enzymaktivität zeigte sich noch instabiler als die aus der Plazenta. Chromatographische Ergebnisse waren daher schlecht zu reproduzieren.

3.2. 2 Komplextrennung durch Einsatz verschiedener Detergentien

Aus vorherigen Untersuchungen an der pLAT gab es Hinweise auf die Existenz großer Komplexe. Diese müßten theoretisch aus einem Großteil verschiedener Lipide, Proteine und dem Zielprotein bestehen. Die Anwesenheit von Acyl-CoA-Bindungsproteinen, wie sie in der Plazenta gefunden wurden, ist dabei nicht ausgeschlossen.

Große Komplexe dieser Art sollten sich durch den Einsatz von Detergentien in die mehr oder weniger enzymatisch aktiven Einzelbestandteile in Form von Mizellen zerlegen lassen. Dies war Ziel der ersten Trennungsversuche.

3.2.2.1 Aufspaltung eines möglichen pLAT-Komplexes

Zur Abtrennung einer möglicherweise niedermolekularen LAT-Aktivität wurden 1mg ammoniumsulfatpräzipitierte und in LAT-Assay-Puffer resuspendierte pLAT mit 0 bis 2 % (w/v) CHAPS für 30 min bei 4°C inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation bei 100.000 xg und 4°C für 60 min resultierte in einem sehr aktiven Pellet (1100 nmol/h) und einem weniger aktiven Überstand (240 nmol/h) (s.Abb. 3.2.4 A und B). Das Pellet zeigt eine Halbierung der Aktivität über 0,5 % CHAPS hinaus. Im Überstand wird mit 0,5 % (w/v) CHAPS dagegen eine partielle Extraktion der LAT-Enzymaktivität (Verdreifachung der Gesamtaktivität im Vergleich ohne Detergens) deutlich.

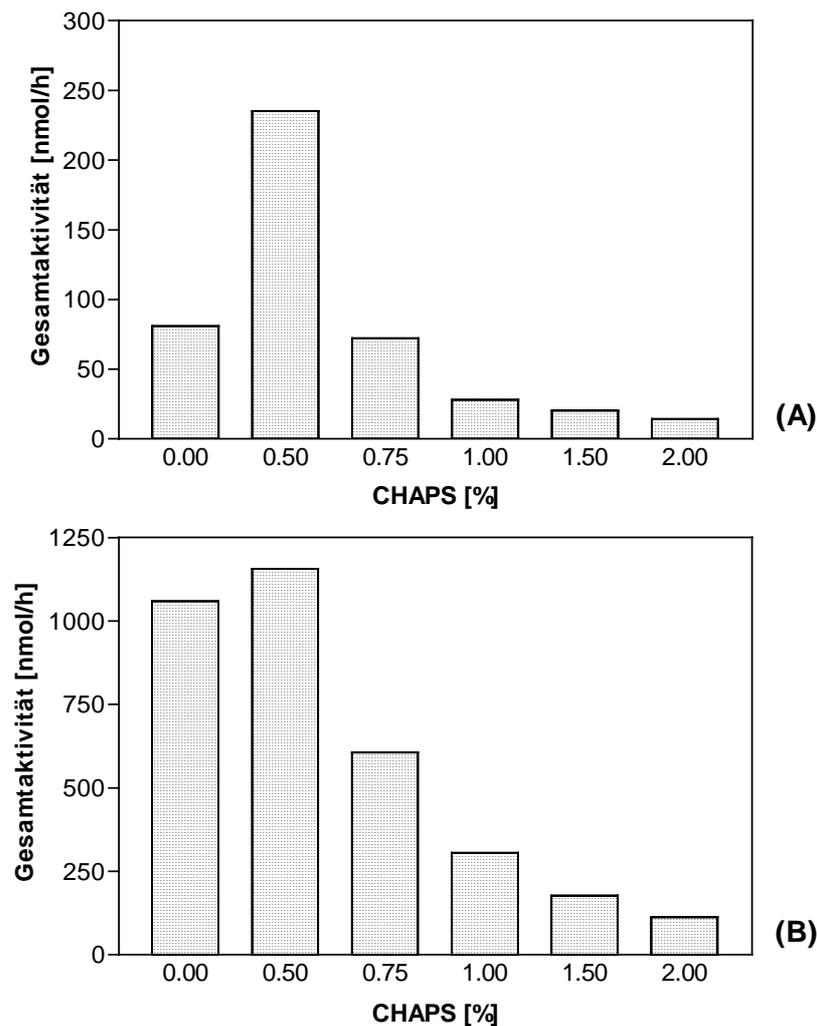


Abb.3.2.4: Auftrennung der pLAT durch CHAPS

Je 1 mg ammoniumsulfatpräzipitierte pLAT wurden mit 0 bis 2 % (w/v) CHAPS für 30 min bei 4°C inkubiert und dann 60 min bei 100.000 xg, 4°C zentrifugiert. Zur Messung der Aktivität wurden 20 µg der Pellets (B) und Überstände (A) im LAT-Assay eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Ergebnissen.

Die erhaltenen aktiven Überstände wurden in der Gelfiltration untersucht.

3.2.2.2 Spaltung des aktiven OGP/NaCl-Komplexes

Der OGP/NaCl-Überstand aus 2.5.5 erwies sich in ersten Gelfiltrationsexperimenten (s. 3.2.3.1) mit einer Größe von über 400 kDa als sehr groß. Auch hier stellte sich die Frage, ob eine Detergensbehandlung eine niedermolekulare aktive Enzymeinheit abspalten würde. Zu diesem Zweck wurde der aktive OGP/NaCl-Überstand in verschiedenen Verhältnissen mit CHAPS, Cholat oder OGP inkubiert und in der Gelfiltration analysiert.

3.2.2.2.1 Detergensabhängigkeit der LAT-Aktivität des OGP/NaCl-Überstandes

Die Wirkungen verschiedener Detergentien auf die LAT-Aktivität wurde im Folgenden untersucht.

3.2.2.2.1.1 CHAPS-Abhängigkeit

Das zwitterionische CHAPS wurde hinsichtlich der Verwendung in der Native PAGE und Gelfiltration getestet. Hierzu wurden 500 µg OGP/NaCl-Überstand im 200 µl Ansatz mit 4, 20, 41, 61 und 81 mM (w/v) CHAPS versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. 22 µg Protein wurden im Assay auf Restaktivität untersucht.

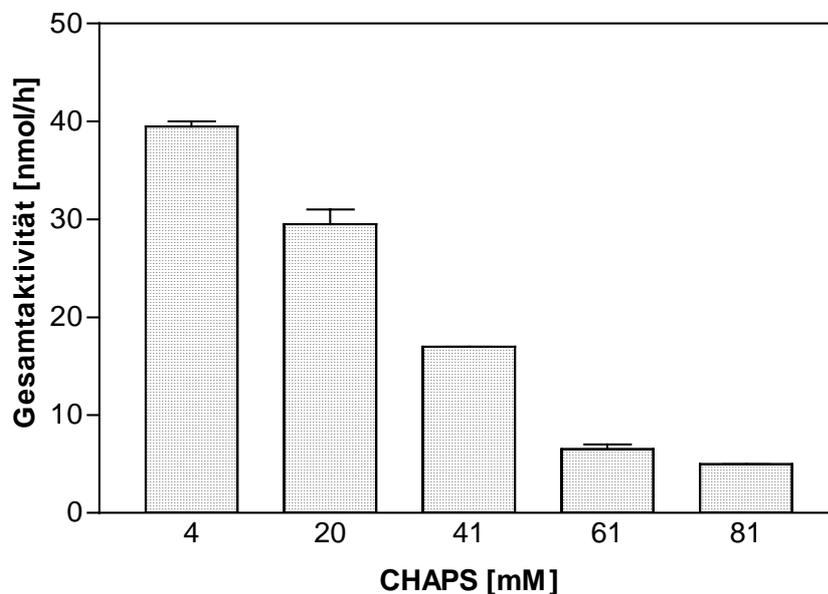


Abb. 3.2.5 Variation der CHAPS-Konzentration

OGP/NaCl-Überstand wurde mit 4 (1:1), 20 (1:5), 41 (1:10), 61 (1:15) und 81 mM (1:20), (w/v) CHAPS versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Angaben in der Klammer stellen das Protein:Detergens-Verhältnis dar. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD eines Experiments (3-fach Ansätze).

Aus der Abbildung ist die Abnahme der LAT-Aktivität mit steigendem Protein:Detergens-Verhältnis sichtbar. Bei einem Verhältnis von 1:10 ist die Aktivität halbiert, zwischen 1:15 und 1:20 ist die weitere Aktivitätsabnahme dagegen gering.

Für die Native PAGE wurde bei einem Verhältnis von 1:20 gearbeitet. Die Gelfiltration wurde mit verschiedenen Protein:Detergens-Verhältnissen durchgeführt.

3.2.2.2.1.1 OGP-Abhängigkeit

Das nichtionische n-Octylglucopyranosid zeichnet sich u. a. durch seine leichte Entfernbarekeit aus Pufferlösungen und wegen seiner neutralen Ladung durch die gute Kompatibilität in chromatographischen Schritten wie z. B. bei Ionenaustauschersäulen aus.

Auch in Hinblick auf die vollständige Solubilisierung des LAT-Enzymkomplexes wurde die folgende Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt.

100 µg OGP/NaCl-Überstand wurden im 1ml Ansatz mit 25, 30, 40, 50, 75 und 100 mM (w/v) OGP versetzt. Nach Inkubation von 45 min bei 4°C wurde die LAT-Aktivität gemessen.

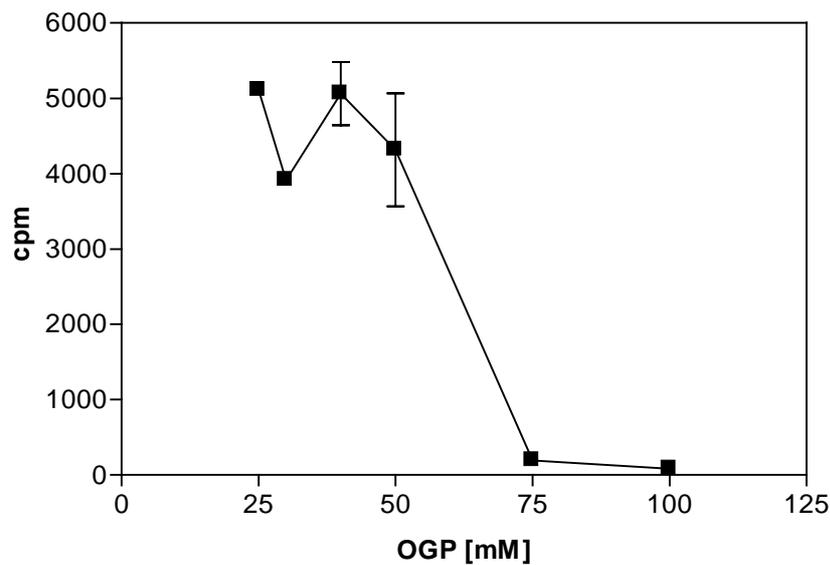


Abb. 3.2.6: OGP-Konzentrationsabhängigkeit

OGP/NaCl-Überstand wurde mit 25, 30, 40, 50, 75 und 100 mM (w/v) OGP versetzt und die LAT-Aktivität nach Inkubation von 45 min bei 4°C gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (3-fach Ansätze) eines repräsentativen von drei Experimenten.

Es ist eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Bei 60 mM ist eine Halbierung der LAT-Aktivität zu erkennen. Dabei entspricht der Bereich 50 bis 75 mM einer Konzentration von 0,73 bis 1,45 % (w/v). In der Gelfiltration wurde eine Konzentration von 1,13 % (w/v) OGP eingesetzt.

3.2.2.2.1.3 Cholat-Abhängigkeit

Das ionische Detergens Cholat wurde zur Solubilisierung ausgewählt, da es Vorteile während einer Rekonstitution mit Liposomen verspricht. In der Ionenaustauscherchromatographie würde es durch Interaktion massiv stören. Sollte dieses Detergens eine Rekonstitution der LAT ermöglichen, wäre es im Vergleich zum CHAPS und OGP um ein Vielfaches billiger und damit ideal für präparative Schritte, zumal es ebenfalls leicht entfernbar ist.

Für eine Konzentrationsreihe wurden 100 µg OGP/NaCl-Überstand in 1ml Ansätzen mit 0, 12, 24, 36, 48 und 120 mM Cholat für 45 min bei 4°C inkubiert und die LAT-aktivität danach gemessen.

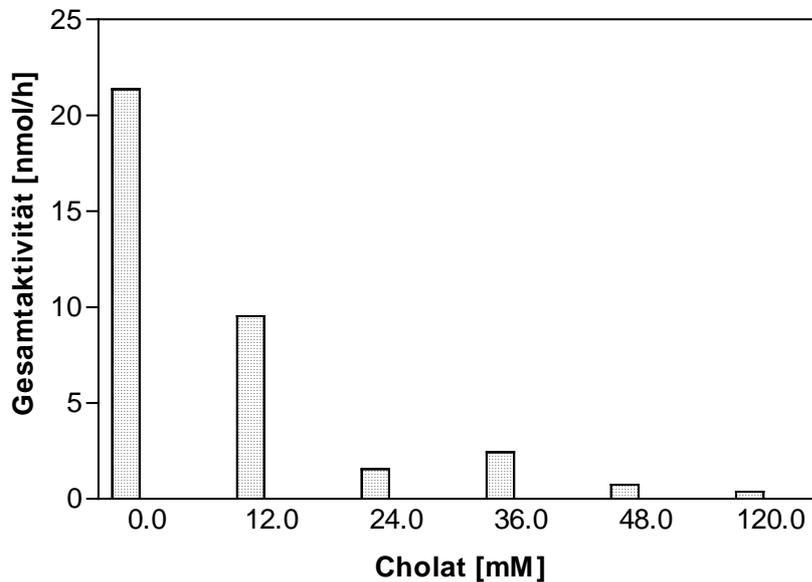


Abb. 3.2.7: Variation der Cholat-Konzentration

OGP/NaCl-Überstand wurde in 1ml Ansätzen mit 0, 12, 24, 36, 48 und 120 mM Cholat für 45 min bei 4°C inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. N=3.

Auch hier zeigt sich eine Abnahme der LAT-Aktivität bei steigender Detergens-Konzentration. Bei 12 mM war die Aktivität mehr als halbiert.

Zur Findung idealer Rekonstitutionsbedingungen wurden nachfolgend unter 12 mM bis 26 mM Cholat (entspricht 0,5 % bis 1,13 %, w/v) eingesetzt. Nach dessen Entfernung sollte eine rekonstituierte Aktivität erneut meßbar sein.

3.2.2.2.2 Rekonstitution der LAT-Aktivität

In einem einfachen Versuch sollte eine mögliche Reaggregation der LAT mit den eigenen Lipiden nach Hochdetergensbehandlung gezeigt werden. OGP/NaCl-Überstand wurde mit 60 mM OGP inkubiert. Im Vergleich zur Kontrolle ohne OGP war die Aktivität nach Dialyse gegen LAT-Assay-Puffer ohne Zugabe von Liposomen komplett zerstört. Eine Reaggregation mit den in der Lösung vorhandenen Lipiden (Lipid/Detergens-Mizellen) war folglich nicht möglich.

Es sollte im weiteren Verlauf geklärt werden, ob die Zugabe von Lipiden mittels verschiedener Techniken zu einer erfolgreichen Rekonstitution der LAT-Aktivität führen kann.

3.2.2.2.1 Rekonstitution mit Erythrozytenlipiden

Die einfachste Art der Rekonstitution erfolgt über den Einsatz natürlicher Lipide, wie sie hier aus Erythrozyten präpariert und eingesetzt wurden.

Die simple Methode der Anbietung dieser Lipide wurde in der Hydrophobizitätschromatographie gezeigt (vgl. Abb.3.2.15). Es wurden dabei pauschal 100 µg Lipide in den Fraktionsröhrchen vorgelegt. Das Resultat in Abb. 3.2.15 zeigt eine mögliche Aktivitätsstabilisierung direkt nach Fraktionsabnahme. In Abb. 3.2.16 sind die gleichen Fraktionen gezeigt. Die Aktivität wurde hierbei nach einer Inkubation mit Lipiden über Nacht bei 4°C nochmals gemessen, wobei sich keinerlei positiver Effekt zeigte.

Da die Elution unter 0,5 % (w/v) OGP in allen Puffern erfolgte, könnte die Anwesenheit der Seife störend auf die Rekonstitution wirken. Die Entfernung von Detergens bedeutet die Verringerung der Konzentration unterhalb der kritischen Mizellarkonzentration. Dies kann z. B. durch einfache Verdünnung erreicht werden.

In einem repräsentativen Versuch wurden hierzu 10 µg Protein in 100 µl aus jedem Ansatz der OGP-Abhängigkeit (Abb. 3.2.6) entnommen, mit 100 µg Erythrozytenlipiden versetzt und dann mit LAT-Assay-Puffer 1:10 verdünnt. Nach 30 min bei 4°C wurde die LAT-Aktivität gemessen.

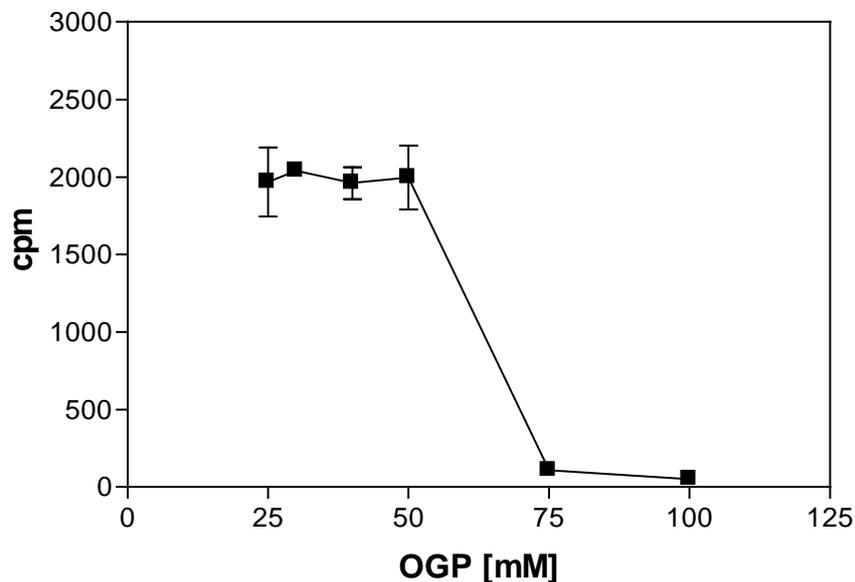


Abb.3.2.8: Rekonstitution durch Verdünnung

10 µg Protein in 100 µl wurden aus jedem Ansatz der OGP-Abhängigkeit (Abb. 3.2.6) entnommen, mit 100 µg Erythrozytenlipiden versetzt und dann mit LAT-Assay-Puffer 1:10 verdünnt. Nach 30 min bei 4°C wurde die LAT-Aktivität (1 µg) gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD (3-fach Ansätze) eines repräsentativen Versuchs von drei Experimenten

Im Vergleich zu Abb. 3.2.6 wird deutlich, daß die Aktivität der LAT im Bereich oberhalb von 50 mM OGP nicht wiederhergestellt wurde. Insgesamt ist die Aktivität durch die Lipidzugabe bzw. der Verdünnung um 1:10 sogar halbiert.

Dieses Ergebnis stimmt mit Cholat-Experimenten überein. Eine Verbesserung der Rekonstitution konnte auch unter Einsatz der Dialyse zur Detergens-Entfernung nicht erzielt werden.

3.2.2.2.2 Rekonstitution mit artifiziellen Lipiden

Aus der Literatur sind Phospholipidkombinationen verschiedenster Art zur Rekonstitution bekannt. Für die Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase (ACAT) wurde z. B. die Kombination Phosphatidylcholin:Cholesterin (5:1) verwendet (*Doolittle et al., 1982*).

Die hier verwendeten Phospholipid-Kombinationen PC:PE:PS (5:3:1), PC:Ch:PE:SPM (10:1,5:1:1) und PC:Ch (10:1,5) wurden unter den Verhältnissen Protein:Liposomen 1:1, 1:2, 1,5 und 1:10 eingesetzt.

Unter Verwendung der Cholat-Dialysemethode gab es keinen Rekonstitutionseffekt. Cholesterin zeigt gegenteilig einen starken Inhibitionseffekt auf die LAT-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Chromatographische Verfahren

Zur Aufreinigung der membran-integrierten LAT wurden verschiedene Chromatographieverfahren auf ihre Trennleistung getestet. Bei der aufgetragenen Proteinfraction handelte es sich, wenn nicht anders beschrieben, um den aktiven OGP/NaCl-Überstand aus 2.5.3.3.

3.2.3.1 Trennung nach Molekulargewicht durch Gelfiltration

Die Gelfiltration zeigte in vorausgehenden Experimenten für den unter Hochsalm isolierten LAT-Anteil (pLAT) bereits ein hohes Molekulargewicht (*Gehring, 1997*). Die Aktivität fand sich ausschließlich im Ausschlußvolumen wieder. Dieses deutete auf große Aggregate von mehr als 300 kDa hin.

Die Analyse wurde auf einer Fractogel[®] EMD BioSEC-Säule mit einem Trennbereich von 5-1000 kDa durchgeführt. Sie hat ein Bettvolumen von 72 ml (Aceton) und ein Ausschlußvolumen von 35 ml (Dextranblau). Soweit nicht anders vermerkt, wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min ohne meßbaren Gegendruck gearbeitet. In der Regel betrug die Fraktionsgröße 5 ml. Als Eluent diente LAT-Assay-Puffer (mit und ohne Detergens).

Zum Vergleich wurde die Trennleistung der Säule mit Standardproteinen in Einzelläufen bestimmt. Dabei wurden die einzelnen Proteine in folgender Reihenfolge eluiert: Ferritin 440 kDa (nach 38 ml), Katalase 232 kDa (41 ml), Aldolase 158 kDa (42 ml), BSA 65 kDa (44 ml) und Lysozym 14,3 kDa (90 ml).

3.2.3.1.1 Gelfiltration der pLAT nach CHAPS-Behandlung

Es wurde zunächst versucht, die pLAT durch die Behandlung mit CHAPS unter Erhaltung der Aktivität zu zerlegen.

Zu diesem Zweck wurden 860 µg ammoniumsulfatpräzipitierter pLAT mit 0,5 % (w/v) CHAPS in 1 ml versetzt und, wie in 3.2.2.1 beschrieben, behandelt. Die gesamte Menge mit einer Gesamtaktivität von 10105 nmol/h wurde auf die Säule aufgetragen. Bei einer Flußrate von 1 ml/min wurden insgesamt 512 nmol/h der Aktivität eluiert. Dies entspricht 5 % der eingesetzten Aktivität. Im Vergleich dazu wurden 320 µg Protein eluiert (37 % des aufgetragenen Proteins).

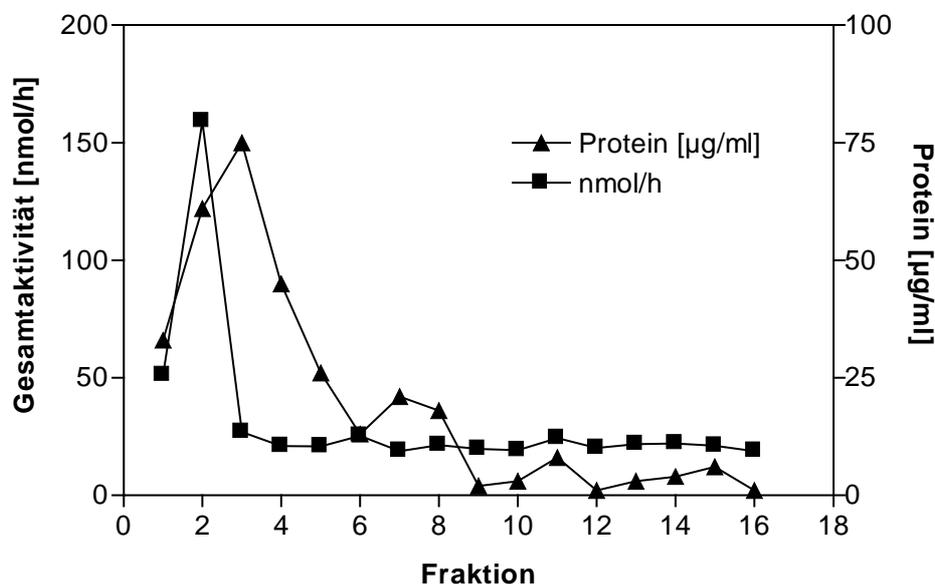


Abb.: 3.2.9 Gelfiltration mit pLAT + 0,5 % (w/v) CHAPS

860 µg pLAT wurden, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, mit CHAPS inkubiert. Mit der Sammlung der 5 ml Fraktionen wurde nach 30 ml Vorlauf begonnen. Eine Fraktion entspricht 5 ml. Gezeigt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten.

Der Hauptteil der LAT-Aktivität wurde dabei in den Fraktionen 1-3 gefunden. Eine Fraktion entspricht einem Volumen von 5 ml, die Fraktionen wurden ab ml 30 gesammelt. Damit befand sich ein Teil der Aktivität immer noch im Ausschlußvolumen. Die restliche Aktivität befand sich überwiegend im MW-Bereich um 440 kDa. Weitere Versuche mit höheren CHAPS-Konzentrationen konnten keine selektive Einwanderung eines Aktivitätspeaks bewirken. Die Aktivität wurde lediglich verringert und einwandernde Aktivitätspeaks hätten eventuell nur mittels Rekonstitution nachgewiesen werden können.

3.2.3.1.2 Gelfiltration mit dem aktiven OGP/NaCl-Komplex

Der aus der integralen LAT durch Solubilisierung erhaltene aktive OGP/NaCl-Komplex wurde mit Hilfe der Gelfiltration untersucht. Verglichen wurden dabei der OGP/NaCl-Überstand mit detergensbehandelten OGP/NaCl-Überständen. Wie unter 3.2.2.2 dargestellt, wurde der aktive Überstand mit CHAPS oder mit OGP behandelt.

3.2.3.1.2.1 OGP/NaCl-Komplex nach CHAPS-Inkubation

Im folgenden wurde der Einfluß von CHAPS auf den OGP/NaCl-Überstand untersucht. Zuerst wurde der Überstand ohne zusätzliches CHAPS auf der Gelfiltrationssäule getrennt. 6,2 mg OGP/NaCl-Überstand mit einer Gesamtaktivität von 27528 nmol/h wurden dazu in 2 ml auf die Säule gegeben und mit einer Flußrate von 1 ml/min mit LAT-Assay-Puffer eluiert. Es zeigte sich die von der pLAT bekannte Aktivitätsverteilung (s. Abb. 3.2.9 (A)) Insgesamt wurden 5300 nmol/h eluiert (19%). Davon befanden sich etwa 50% im Durchlauf. Der Rest verteilte sich sehr breit bis in einem Molekulargewichtsbereich von 65 bis über 440 kDa.

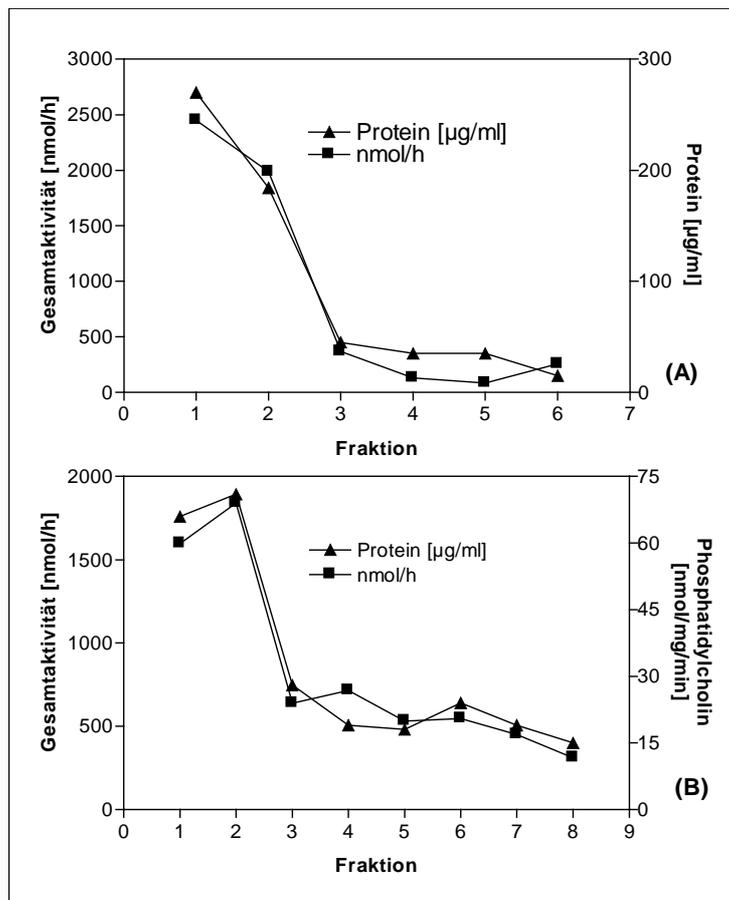


Abb.3.2.10: Fractogel mit OGP/NaCl-Überstand

6,2 mg OGP/NaCl-Überstand wurden mit LAT-Assay-Puffer eluiert. Nach 30 ml Vorlauf wurden 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionszahlen entsprechen je 5 ml. Gezeigt ist eins von fünf Experimenten.

Zur Abtrennung von kleinen Proteinen wurden die Fraktionen 1 und 2 (10 ml) aus Abb. 3.2.10 (A) vereinigt und per Ultrafiltration konzentriert. Das Eluat zeigte hier bei einer Filterausschlußgrenze von 100 kDa keine LAT-Aktivität, während 2 ml Konzentrat mit 1870 mg Protein noch 4437 nmol/h enthielten.

Nachfolgend wurden 936 µg Protein aus dem ersten Säulenlauf (A) im Verhältnis 1:15 (w/v) mit CHAPS bzw. ohne Detergens für 30 min bei 4°C inkubiert und dann auf die Säule aufgetragen.

Der Säulenlauf (Daten nicht gezeigt) zeigt einen erwarteten Aktivitätsverlauf. Die Hauptaktivität ist bis zur Fraktion 2 eluiert (40 ml), während ein Bruchteil weiter auf der Säule „schmiert“. Der Verlauf ist daher mit dem Säulenlauf (A) vergleichbar.

Durch die Behandlung mit CHAPS ist der Aktivitätsverlauf auf der Säule (s. Abb. 3.2.10 (B)) kaum verändert. Auch hier ergibt sich keine diskrete Abtrennung einer Enzymaktivität. Die Hauptaktivität ist auch hier nach 40 ml eluiert.

Das Molekulargewicht der LAT im OGP/NaCl-Überstandes bleibt daher oberhalb von 230 kDa angesiedelt. Versuche mit Protein:Detergens-Verhältnissen von 1:10 oder 1:20 zeigten keine Verbesserung der Trennung.

Der ähnliche Verlauf der meisten Säulenläufe führte zur Annahme, daß eine Komplexspaltung mit CHAPS allein nicht ausreichen könnte. Vielmehr könnte es erforderlich sein, den kompletten Puffer mit Detergens zu versetzen, um eine Reaggregation während des Laufes zu verhindern.

Dem LAT-Puffer wurde zu diesem Zweck 0,1 % CHAPS zugesetzt. Diese Experimente zeigten, daß verstärkt kleine Proteine auf der Säule gebunden hatten. In der Gesamtaktivität spiegelte sich dies nicht wieder.

3.2.3.1.2.2 Markierung von Gelfiltrations-Fraktionen mit ASO-CoA

Der OGP-NaCl-Überstand wurde in einem breiten Peak von der Säule eluiert. Aktivität wurde in einen Molekulargewichtsbereich von über 440 bis unter 65 kDa registriert. Es war daher interessant, den Verlauf der Proteine auf einem SDS-Gel zu verfolgen und außerdem entsprechende Fraktionen radioaktiv mit dem Photoaffinitätsmarker zu markieren, um mögliche LAT-Kandidatenproteine zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden je 40 µl Probe der Fraktionen 2-5 aus der Gelfiltration des OGP/NaCl-Überstandes ohne Detergens mit 250 µM ASO-CoA ± 100 µM Arachidonoyl-CoA inkubiert (s. 2.3.2). Das Arachidonoyl-CoA (ACoA) diente zur Verdrängung des Photoaffinitätsmarkers. Nach der Photolyse wurden die Proben auf einem Lamli-SDS-Gel gelelektrophoretisch getrennt und mit Coomassie gefärbt. Die markierten Proteine wurden auf einem Autoradiographiefilm (Abb. 3.2.11) visualisiert.

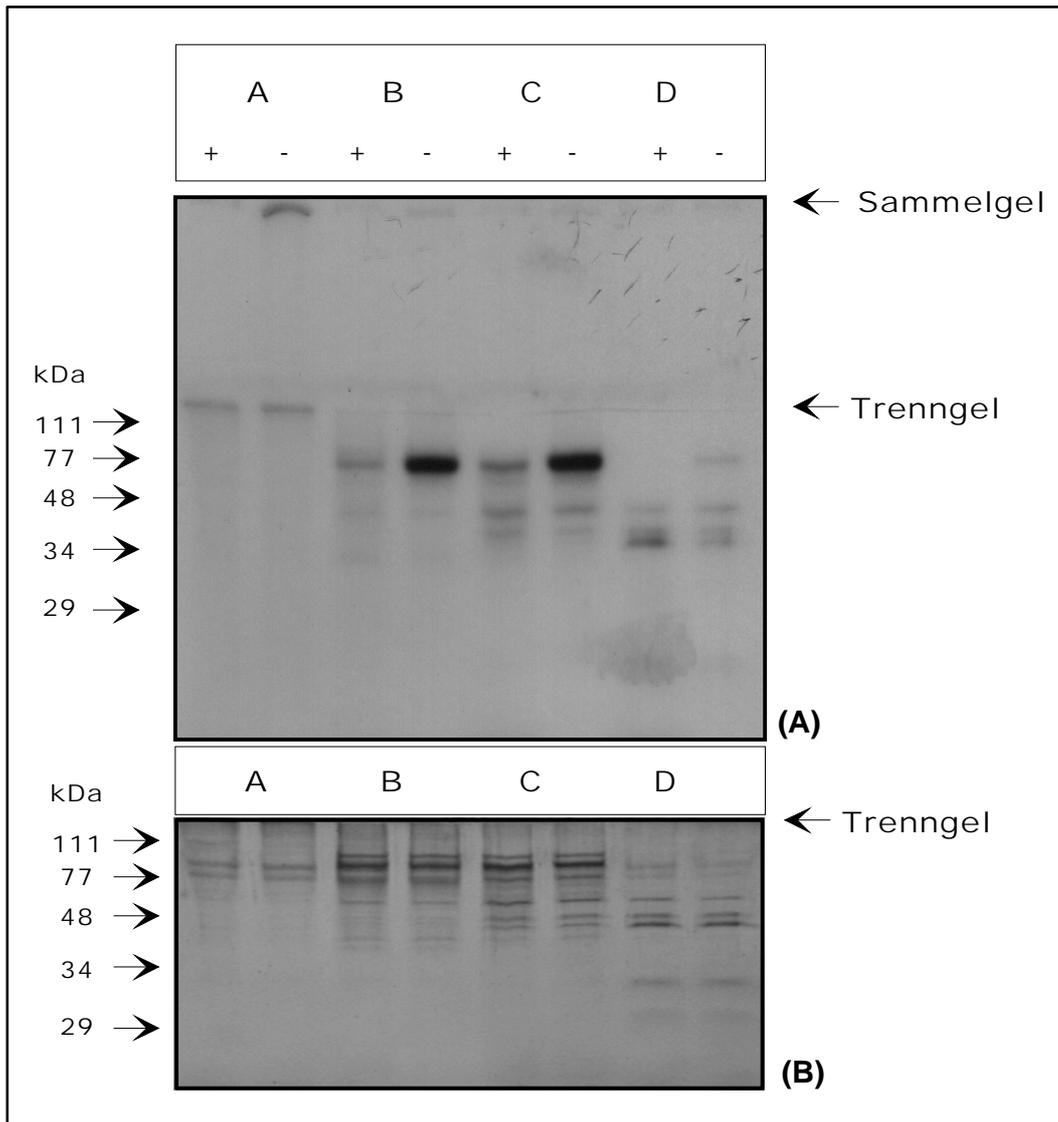


Abb.3.2.11: Photoaffinitätsmarkierung der Gelfiltrationsfraktionen 2-5 des OGP/NaCl-Überstandes

40 μ l der Fraktionen 2-5 der Gelfiltration mit dem OGP/NaCl-Überstand ohne Detergenzzugabe wurden mit 250 μ M ASO-CoA und zur Konkurrenz mit \pm 100 μ M ACoA inkubiert. Nach 1 min UV-Bestrahlung wurden die Proteine auf einem SDS-Gel (A) getrennt (12,5 % Trenngel) und CBB-gefärbt. Markierte Proteine wurden auf der Autoradiographie (B) sichtbar. Reihenfolge der Fraktionen: A=2, B=3, C=4 und D=5.

Es ist deutlich eine unterschiedliche Proteinverteilung zu erkennen. Der Photaffinitätsmarker hat verschiedene Banden markiert. In der Fraktion 2 (A) ist auch in der Geltasche Protein markiert und von ACoA verdrängbar. Es gibt Banden, die das ASO-CoA binden wie z. B. in Fraktion 5 (D) eine 32 kDa Bande, die aber nicht vom ACoA verdrängt werden.

Lediglich in zwei Banden des Trenngels ist eine Konkurrenz mit ACoA erfolgreich. Es handelt sich dabei um eine 75 kDa und eine 40 kDa Bande. Diese Banden sind sehr wahrscheinlich humanes Serumalbumin (75 kDa) und Annexin V (40 kDa) und wurden daher nicht weiter berücksichtigt, denn beide wurden schon mit Hilfe des ASO-CoA in pLAT-Fraktionen identifiziert (Gehring, 1997).

3.2.3.1.2.3 OGP/NaCl-Komplex nach OGP-Inkubation

Der OGP/NaCl-Überstand war, zeitlich gesehen, stabiler als der CHAPS-Überstand. Daher wurde ebenfalls versucht, mit OGP eine Komplexspaltung zu erzielen. Das Ergebnis war vergleichbar mit den vorausgegangenen CHAPS-Versuchen. Auch hier lag die Vermutung nahe, daß eine Spaltung alleine nicht genügen würde, sondern auch eine Reaggregation des Komplexes verhindert werden müßte.

1,7 mg OGP/NaCl-Überstand mit 21029 nmol/h Gesamtaktivität wurden mit OGP im Verhältnis 1:20 versetzt und auf die Gelfiltrationssäule gegeben. LAT-Assay-Puffer mit 0,5 % (w/v) OGP diente zur Elution.

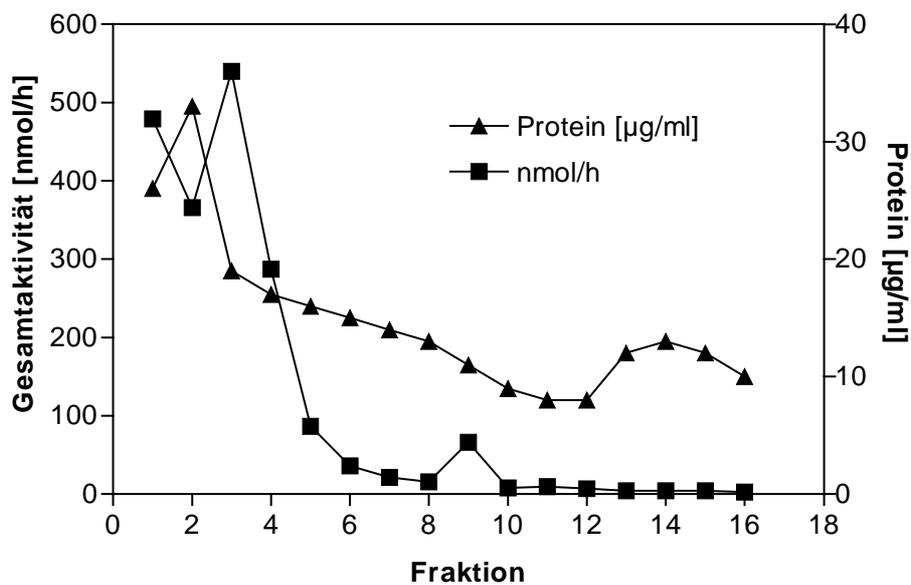


Abb.: 3.2.12: Gelfiltration mit OGP/NaCl-Überstand unter 1:20 OGP und 0,5 % (w/v) OGP im Puffer
1,7 mg OGP/NaCl-Überstand wurden mit CHAPS 1:20 versetzt und mit OGP-haltigem (0,5 % w/v) LAT-Assay-Puffer eluiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Von der aufgetragenen Aktivität wurden nur 1939 nmol/h eluiert, was mit 9 % einen deutlichen Aktivitätsverlust bedeutet. Es kommt unter diesen Bedingungen offenbar zu einer leichten Verschiebung der Aktivität, da der Hauptteil der LAT-Aktivität zwischen der zweiten und vierten Fraktion meßbar war. Dies entspricht einem Molekulargewichtsbereich von unter 60 bis ca.250 kDa. In Fraktion 9 (75 ml) ist z. T. Aktivität meßbar. Dies entspräche einem MW von ca. 20 kDa und wäre damit sehr klein.

Die aktive Fraktion 3 dieser Gelfiltration wurde auch in Kombination mit der an Sepharose gekoppelten 18-Amino-Ölsäure verwendet (s.3.2.3.7).

Da alle Gelfiltrationsergebnisse auf überwiegend hochmolekulare Formen der LAT hinwiesen, wurde eine möglicherweise selektive Anreicherung von Proteinen in diesem MW-Bereich auf einem SDS-Gel untersucht.

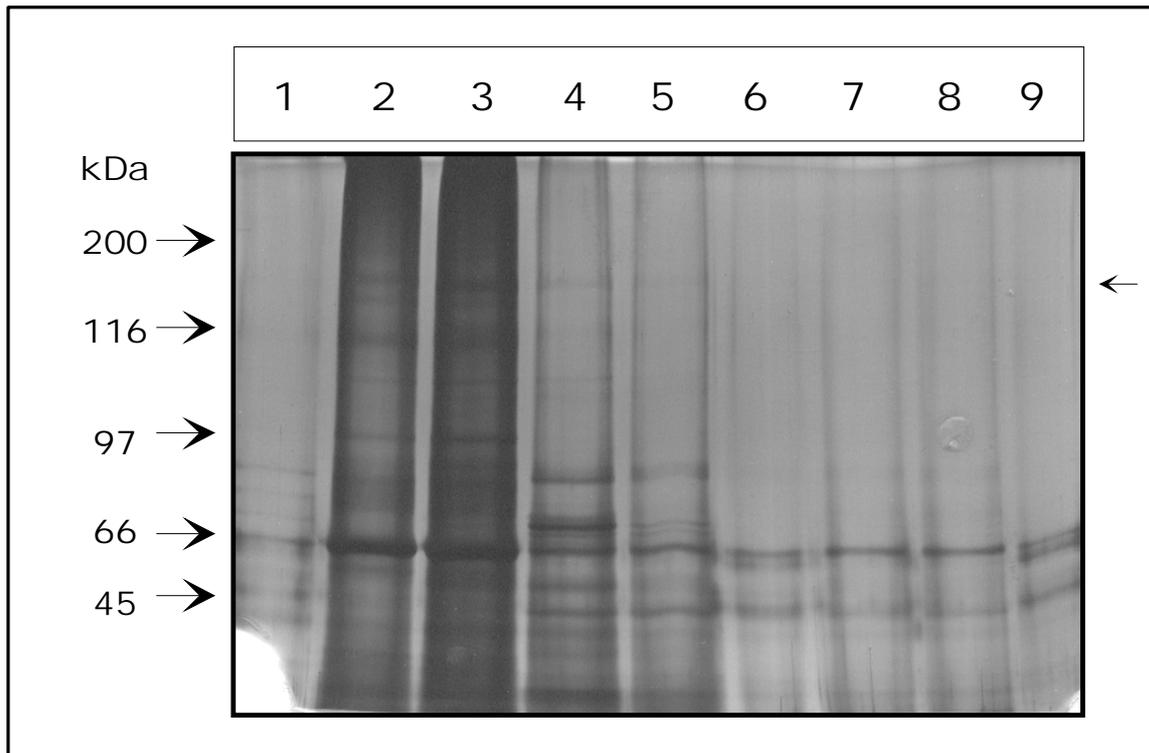


Abb.3.2.13: SDS-Gel mit Fraktionen der Gelfiltration OGP/NaCl-Überstand unter 1:20 OGP und 0,5 % (w/v) OGP im LAT-Assay-Puffer

Die Fraktionen 1-9 der Gelfiltration (Abb. 3.2.12) wurden komplett nach Wessel & Flügge gefällt und mit 40 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Trennung fand auf einem 7,5 % Trenngel statt, gefolgt von einer Silberfärbung. Der Pfeil markiert eine angereicherte Bande von 160 kDa.

Aus dem Gel der Gelfiltrationsfraktionen geht deutlich die Trennung der Moleküle nach ihrer Größe hervor. Während sich in der ersten Fraktion noch kaum Protein befindet, sind in den Fraktionen 2 und 3 überwiegend große Moleküle anzutreffen. Mehrere Banden in Fraktion 2 und 3 korrelieren mit dem Verlauf der LAT-Aktivität und wären Kandidatenproteine für eine Mikrosequenzierung. Die 160 kDa Bande war unter Heranziehung weiterer Trennmethode sehr interessant und wurde später als α -2-Makroglobulin identifiziert (s.3.4.1) Die Fraktionen 4 bis 9 zeigen nur noch Proteine unterhalb von 100 kDa. Eine ca. 70 kDa große Bande ist in Fraktion 4 deutlich angereichert: diese stimmt aber nicht mit dem Aktivitätsprofil überein.

3.2.3.2 Hydrophobizitätschromatographie

Aus Messungen an pLAT-Fraktionen war bekannt, daß eine Bindung der LAT-Aktivität an Phenyl-Sepharose nicht erfolgte und an Butyl-Sepharose sehr gering war. Die Erfahrungen mit der integralen LAT deuteten jedoch diesbezüglich auf bessere Bindungscharakteristika hin, zumal durch die Solubilisierung auf hydrophobe Proteine selektiert wurde.

Hierzu wurden 745 μ g OGP/NaCl-Überstand auf 25 mM OGP (entspricht dem cmc-Wert von OGP) und 2 M NaCl eingestellt und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Zunächst wurde mit 10 ml 10 mM Tris pH 7.4 + 2 M NaCl + 0,5 % (w/v) OGP gewaschen, dann wurde

mit 10 ml 10 mM Tris pH 7.4 + 0,5 % (w/v) OGP ein absteigender Salzgradient (bis 0 M NaCl) erzeugt. 1 ml Fraktionen wurden aufgefangen und 100 μ l davon im LAT-Assay auf Aktivität getestet.

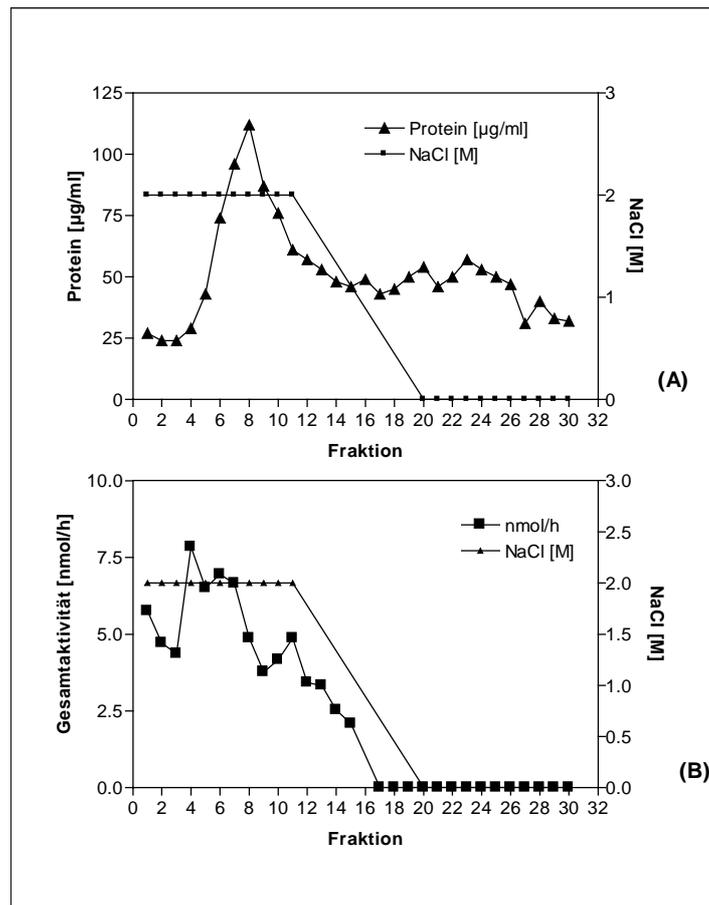


Abb.3.2.14: Butyl-Sepharose-Elutionsprofil

OGP/NaCl-Überstand in 10 mM Tris pH 7.4 + 2 M NaCl und 25 mM OGP wurde auf die Säule aufgetragen und unter 0,5 % (w/v) OGP mit einem absteigenden NaCl-Gradienten eluiert. (A) zeigt den NaCl-Gradienten mit dem zugehörigen Proteinelutionsprofil, (B) den Verlauf der LAT-Aktivität in den einzelnen Fraktionen. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei Läufen.

Aus dem Proteinelutionsprofil geht hervor, daß eine Proteinbindung erfolgt und das Protein kontinuierlich bei Verringerung der Salzkonzentration eluiert. Der Aktivitätsverlauf zeigt bei 2 M NaCl einen aktiven Proteindurchlauf. Im Verlauf des Gradienten zeigt sich ab Fraktion 12 bei einer NaCl-Konzentration von 1 M weitere Elution von LAT-Aktivität. Ein deutlich abgetrennter Aktivitätspeak ist nicht zu erkennen.

Die generelle Bindung von LAT-Aktivität an Butyl-Sepharose wurde zum Anlaß genommen, den OGP/NaCl-Komplex mit Detergens über den CMC hinaus zu versetzen, um eine mögliche Komplextrennung zu verfolgen bzw. um eine selektivere LAT-Bindung zu bewirken. Um eine völlige Zerstörung der LAT-Aktivität zu vermeiden, wurden präventiv 100 μg Erythrozytenlipide (EL) in die Fraktionsröhrchen vorgelegt.

Hierzu wurden 745 μg OGP/NaCl-Überstand auf 50 mM OGP (entspricht dem doppelten cmc-Wert) und 2 M NaCl eingestellt und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte wie in Abb.3.2.14.

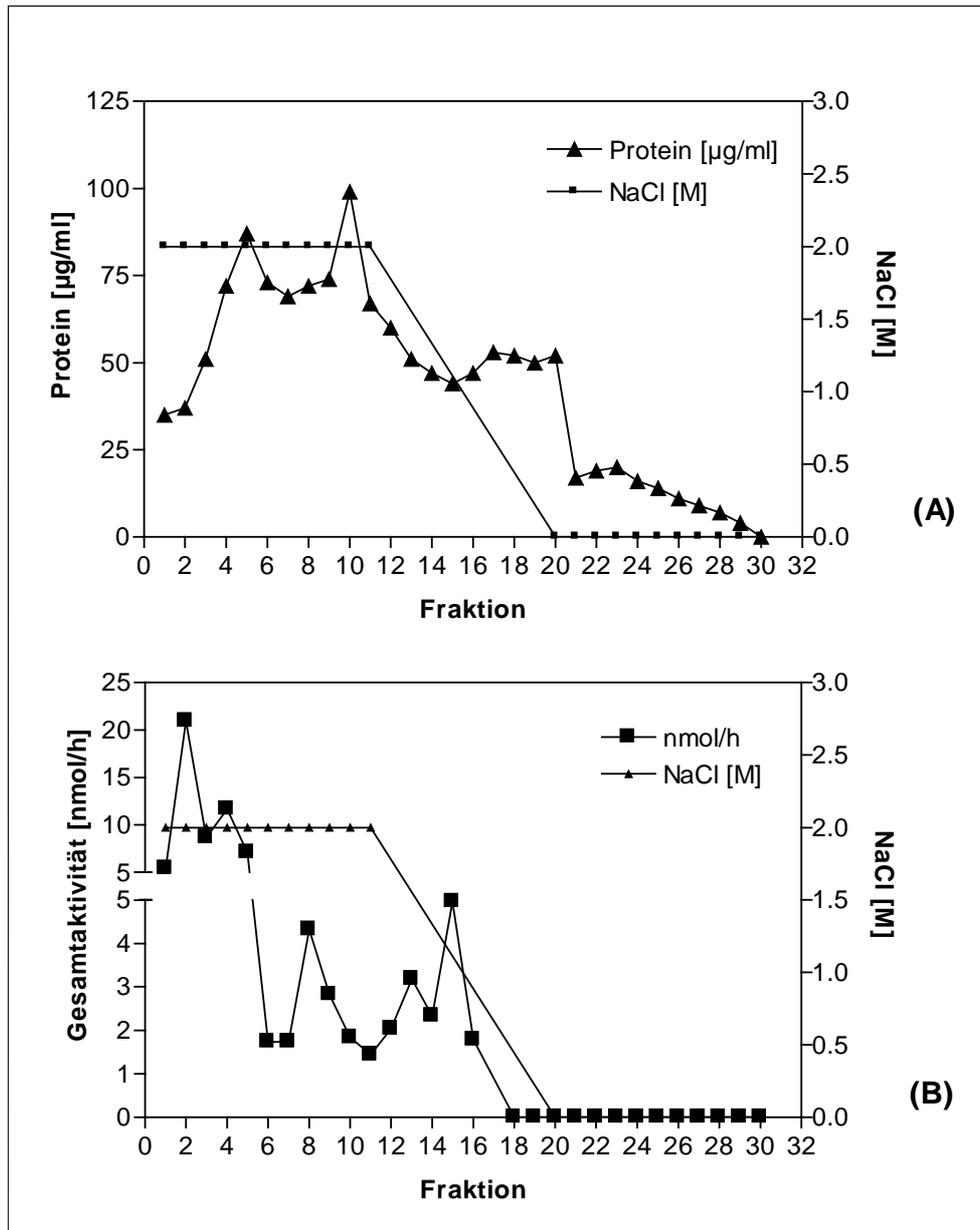


Abb. 3.2.15: Butyl-Sepharose mit OGP/NaCl-Überstand nach 50mM OGP

Der OGP/NaCl-Überstand wurde auf 50 mM OGP eingestellt und wie unter Abb.3.2.14 eluiert. In den Fraktionsröhrchen waren je 100 μg EL vorgelegt. (A) zeigt den NaCl-Gradienten und den Proteinverlauf, (B) den Aktivitätsverlauf nach sofortiger Messung. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Aus den 1 ml Fraktionen wurden 100 μl sofort (ohne Inkubationszeit) zum Messen der LAT-Aktivität verwendet. Der Rest wurde bei 4°C über Nacht mit den Erythrozytenlipiden inkubiert, um eine mögliche Rekonstitution zu beobachten (s. Abb.3.2.16).

Die Abb. 3.2.15 zeigt im Vergleich zur Abb. 3.2.14 ein deutlich verändertes Protein- und Aktivitäts-Elutionsprofil. Es gab zwei Proteinpeaks im Durchlauf während der Elution mit 2 M NaCl. Mit absteigendem NaCl-Gradienten eluierte sukzessive Protein. In den Fraktionen 16 bis 18 deutete sich dabei ein Peak an. Unter 0 M NaCl wurde restliches Protein eluiert.

Das Aktivitätsprofil zeigte einen Großteil der Aktivität im Durchlauf in den Fraktionen 1-6 sowie 8. Unter der Verringerung der NaCl-Konzentration zeigten sich zwei Aktivitätspeaks im Bereich 1,7- 0,5 M NaCl.

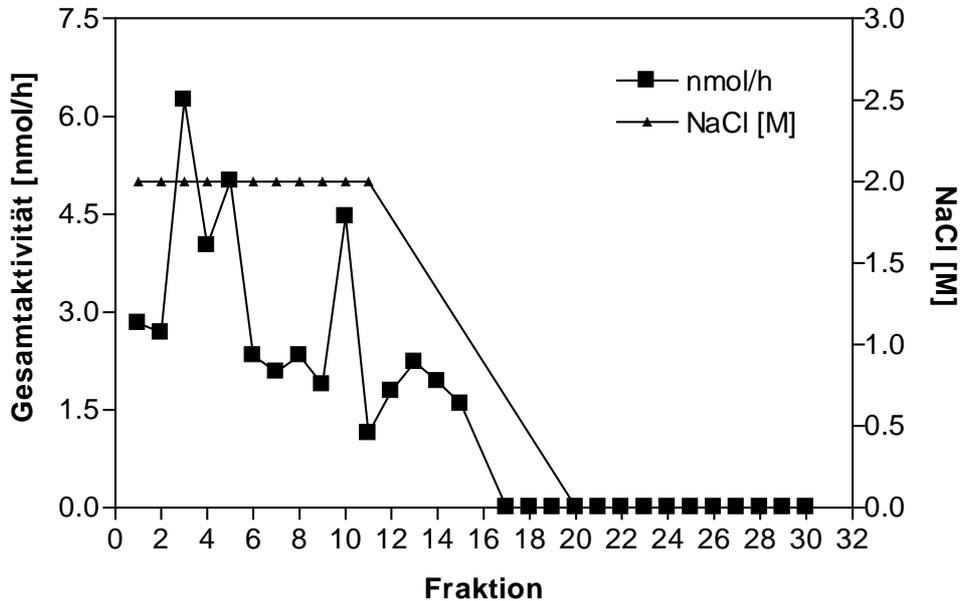


Abb.3.2.16: LAT-Aktivität nach Butyl-Sepharose und Rekonstitution mit EL

Die aufgefangenen Fraktionen aus Abb.3.2.15 wurden mit 100 µg Erythrozytenlipiden versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Aktivität der Fraktionen wurde dann nochmals gemessen.

Durch die Inkubation der Butyl-Sepharose-Fraktionen mit 100 µg Erythrozyten konnte keine Rekonstitution erreicht werden. Die Aktivität sank in den Fraktionen um bis zu 70 %.

3.2.3.3 Anionentauscher

Experimente mit der pLAT konnten eine Abtrennung der LAT-Aktivität vom Hauptprotein bei einer NaCl-Konzentration zwischen 300–350 mM bewirken. Die SuperQ-Anionentauscher-Säule der Fa. TosoHaas erschien daher eine geeignete Methode zur Vorseparation größerer Mengen aktiver LAT.

Die Nützlichkeit dieses Verfahrens im Rahmen der iLAT-Reinigung wurde im folgenden untersucht.

OGP/NaCl-Überstand wurde gegen 10 mM Tris pH 8.5 dialysiert und dann bei einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen (923 µg in 1 ml). Die Elution wurden mit einem aufsteigenden linearen NaCl-Gradienten bis zu einer finalen Konzentration von 1 M NaCl in 10 mM Tris pH 8.5 durchgeführt. Fraktionen von 1 ml Volumen wurden aufgefangen und auf LAT-Aktivität untersucht.

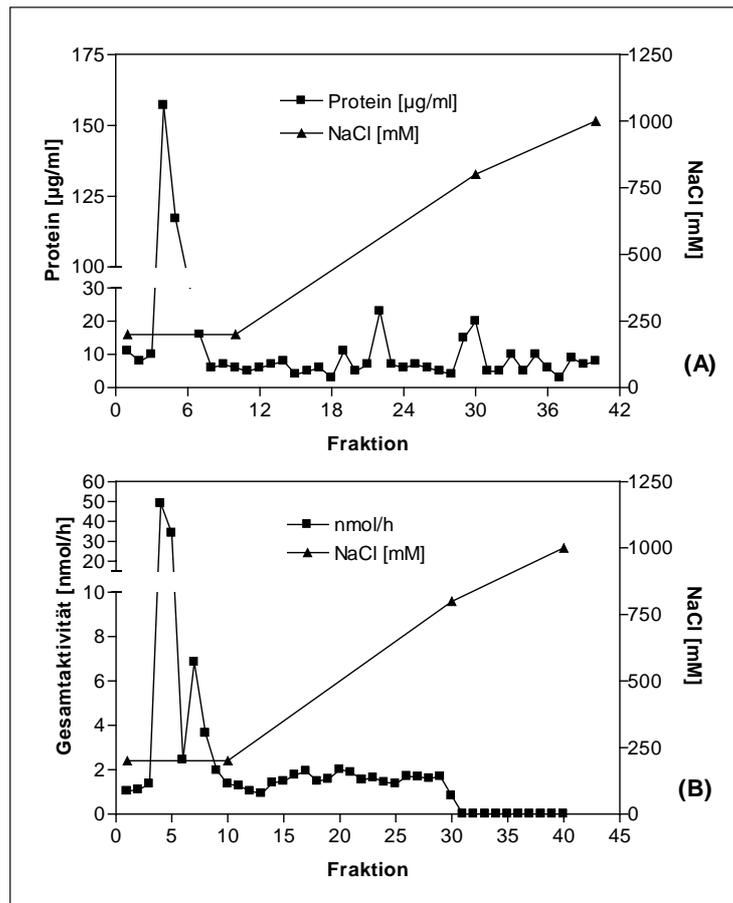


Abb. 3.2.17: Elutionsprofil der SuperQ-Säule

OGP/NaCl-Überstand in 10 mM Tris pH 8.5 wurde mit einem aufsteigendem NaCl-Gradienten eluiert. (A) zeigt das Protein- und (B) das Aktivitätsprofil. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Das Proteinprofil zeigt, daß der überwiegende Anteil des Proteins im Durchlauf erscheint. Lediglich zwei kleine Proteinpeaks wurden zwischen 520 und 600 bzw. 740 und 800 mM NaCl eluiert. Die Aktivität liegt komplett im Durchlauf. Von der Säule konnte kein aktives Protein eluiert werden. In weiteren Versuchen mit Detergens im Puffer wurde ebenfalls keine Aktivität von der Säule eluiert. Auch die Proteinbindung wurde vollständig unterdrückt.

3.2.3.4 Anreicherung von LAT-Aktivität durch Hydroxylapatit

Als ein weiteres Verfahren zur Aufreinigung der integralen LAT-Aktivität sollte die Hydroxylapatit-Chromatographie herangezogen werden. Aus keramischen Hydroxylapatit wurde eine analytische Säule mit einem Bettvolumen von 7 ml hergestellt.

Für diese Experimente wurden 1,73 mg OGP/NaCl-Überstand in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gelöst und in 1 ml unter einer Flußrate von 1ml auf die Säule gegeben. Es erfolgte zunächst ein Waschschrift mit 14 ml 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7. Die Phosphatkonzentration wurde dann mit dem 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 auf

175 mM eingestellt und linear innerhalb von 10 ml auf 220 mM erhöht. Die Puffer I und II wurden dann gegen 1 M KCl-haltige Puffer (III und IV) ersetzt. Der Gradient wurde über 10 ml von 220 mM auf 500 mM Phosphat fortgesetzt unter Anwesenheit von 1 M KCl. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und im LAT-Assay auf Aktivität getestet.

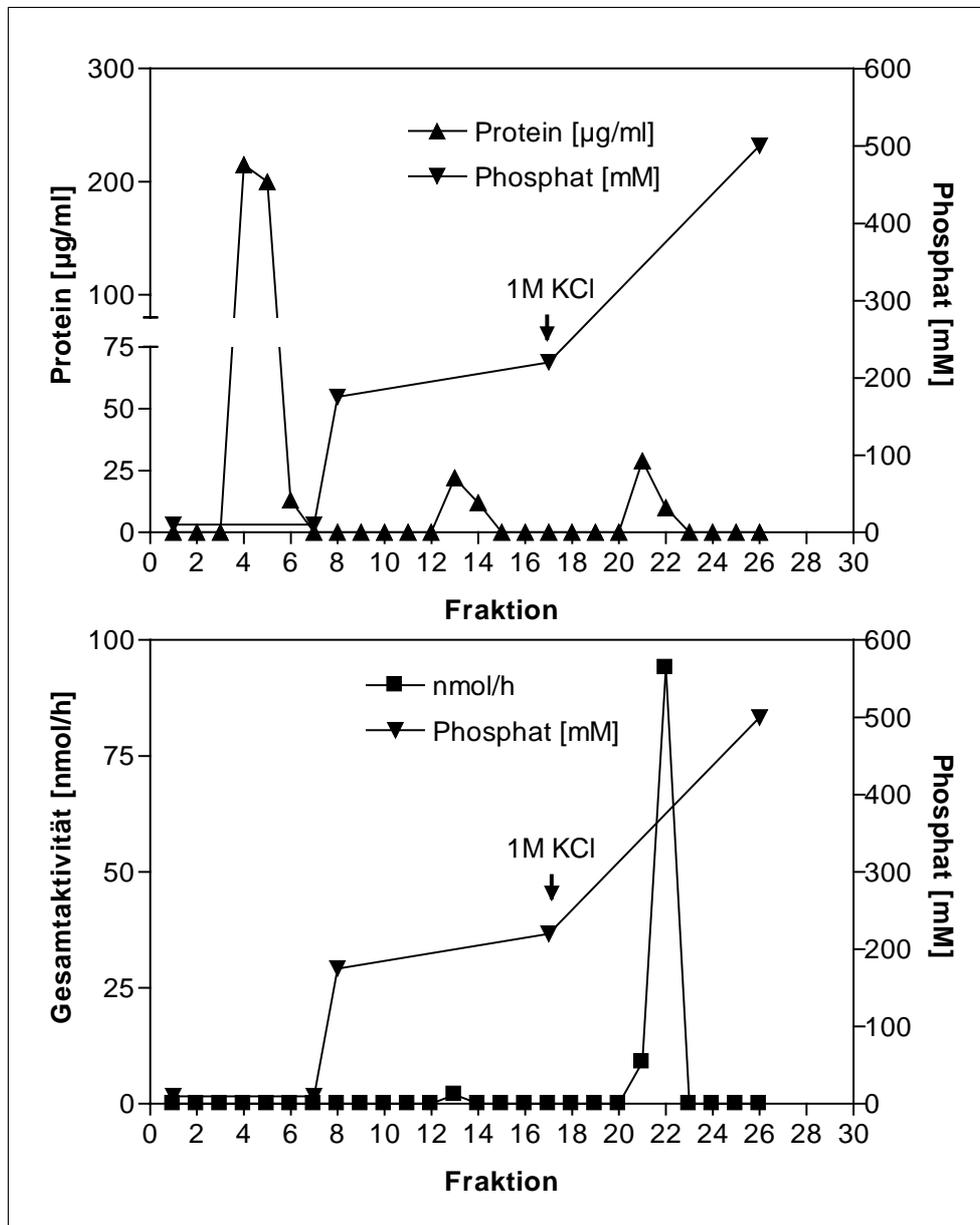


Abb.3.2.18: Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Säule

OGP/NaCl-Überstand wurde in 10 mM Kaliumphosphatpuffer auf die Säule gegeben und mit einem nichtlinearen Phosphatgradienten von 175 bis 220 bzw. 220-500 mM unter 1 M KCl eluiert. In (A) ist die Proteinelution und in (B) die Elution von LAT-Aktivität gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentativer von sieben Läufen.

Das Proteinelutionsprofil in Abb.3.2.18 zeigt einen breiten Durchlauf in den Fraktionen 4-6. Diese Fraktionen zeigen keine Aktivität. Von der Säule wurde mit 180 bis 220 mM Phosphat 50 % des gebundenen Proteins eluiert. Auch diese Fraktion enthielt kaum Aktivität. Unter

310-410 mM Phosphat und 1 M KCl wurde eine weitere Proteinfraction isoliert, die eine Gesamtaktivität von 100 nmol/h enthält.

In einem im Gradienten identischen Säulenlauf wurden 2,8 mg aktiver CHAPS-Überstand in gleicher Weise aufgetragen und eluiert.

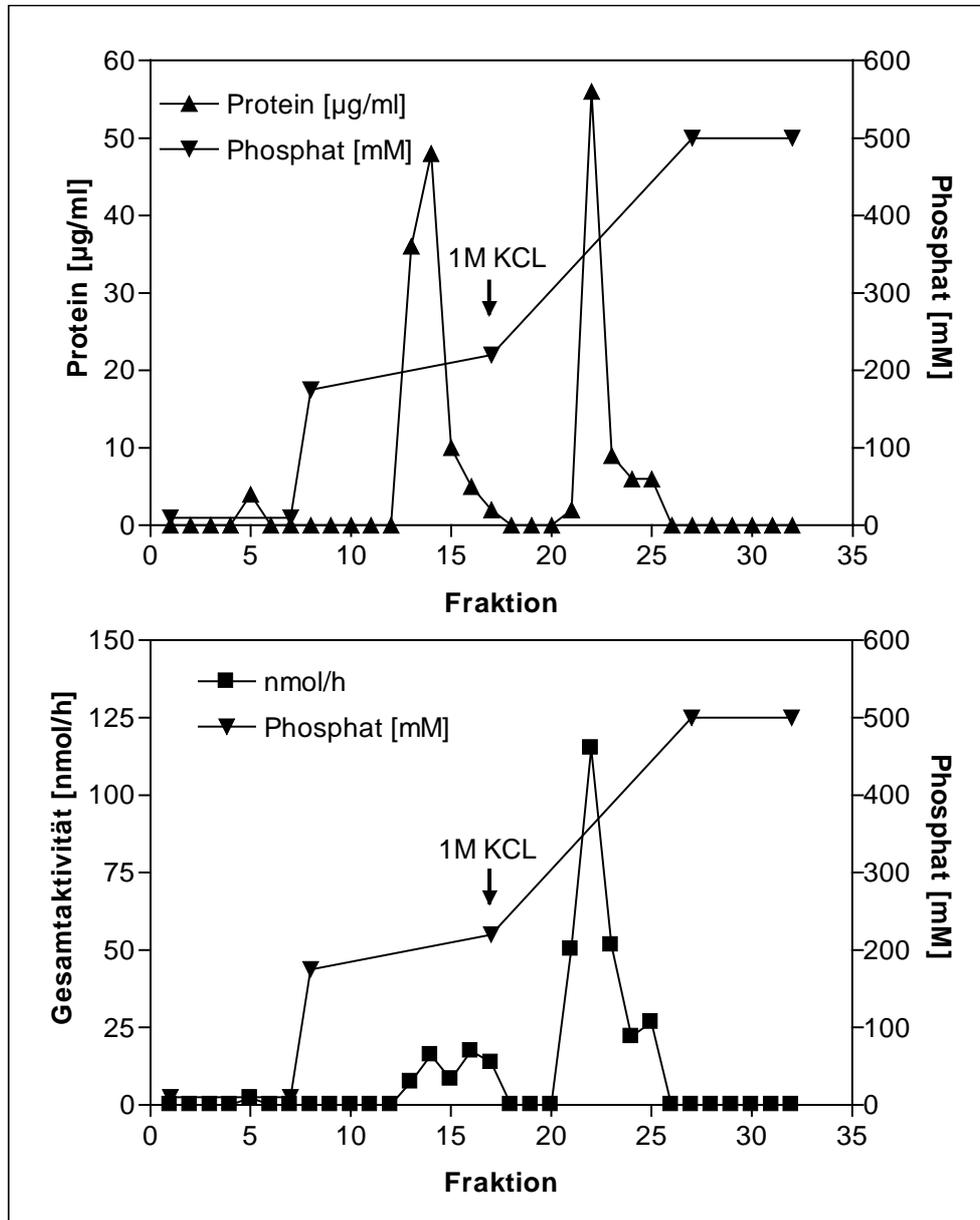


Abb. 3.2.19: Hydroxylapatitchromatographie mit CHAPS-Überstand

Aktiver CHAPS-Überstand wurde in 10 mM Kaliumphosphatpuffer auf die Säule gegeben und mit einem nichtlinearen Phosphatgradienten von 175 bis 220 bzw. 220-500 mM unter 1 M KCl eluiert. In (A) ist die Proteinelution und in (B) die Elution von LAT-Aktivität gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei Läufen.

Im Vergleich zur Hydroxylapatit mit dem OGP/NaCl-Überstand ist in Abb. 3.2.19 die Bindung von Protein auf der Säule höher. Der Durchlauf enthält sehr wenig Protein mit vernachlässigbarer Aktivität. Mit 190 bis 220 mM Phosphat wurde ein erster Proteinpeak mit geringer (maximal 24 nmol/h) Aktivität eluiert. Ein zweiter Proteinpeak konnte mit 325 bis

450 mM Phosphat unter 1 M KCl abgetrennt werden. Dieser enthielt den größten Teil der Aktivität mit bis zu 120 nmol/h.

Es ist mit beiden Präparationsfraktionen (OGP/NaCl- und CHAPS-Überstand) eine deutliche Abtrennung der Aktivität vom Hauptprotein zu erkennen und die Hydroxylapatitsäule eignet sich daher sehr gut für die Kombination mit weiteren Chromatographiemethoden für die Aufreinigung der LAT.

Vergleichbare Versuche mit OGP/NaCl-Überständen auf einer präparativen Hydroxylapatit-Säule mit einem 50 ml Bettvolumen zeigten einen sehr ähnlichen Protein- und Aktivitätsverlauf. Die Aktivität wurde hier in einem Bereich zwischen 375 und 500 mM Phosphat unter 1 M KCl als breiter Peak eluiert. Die Verluste an Protein und Aktivität waren auf dieser Säule sehr hoch und sie konnte daher mit dem OGP/NaCl-Überstand nicht effizient zur Aufreinigung beitragen.

3.2.3.5 Phase-Transition-Chromatographie mit Transil[®]

Das Transil[®]-Material der Firma Nimbus wurde, wie unter 2.5.5.5.4 beschrieben, mit dem Lysophospholipid-Substrat der LAT beschichtet. Im folgenden wurde getestet, ob generell eine Proteinbindung stattfindet bzw. unter welchen Bedingungen gebundenes Protein eluierbar ist. Alle beschriebenen Versuche wurden im Batchverfahren durchgeführt.

3.2.3.5.1 Elution unter Temperaturveränderung

0,5 ml Transilmaterial wurden mit LAT-Assay-Puffer equilibriert und im Anschluß 3,2 mg Protein bei 4°C aufgetragen. Dann wurde mit 5x 1 ml LAT-Assay-Puffer (4°C) nacheinander gewaschen (Fraktion 1-5). Alle weiteren Elutionen bis auf Fraktion 8 wurden mit LAT-Assay-Puffer durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei in Batch 6 auf 10°C und in Batch 7 auf 15°C erhöht. Die letzte Elution erfolgte unter 1,5 M NaCl in LAT-Assay-Puffer bei 15°C. 100 µl jeder Fraktion wurden auf LAT-Aktivität getestet.

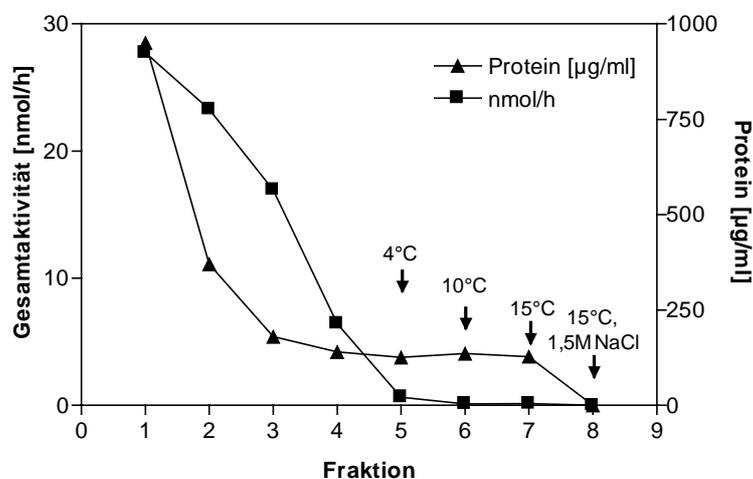


Abb. 3.2.20: Temperaturabhängigkeit der LAT-Bindung an Transil[®]

OGP/NaCl-Überstand wurde im Batchverfahren auf das Transilmaterial aufgetragen und mit LAT-Assay-Puffer unter Temperaturerhöhung eluiert. Fraktion 8 wurde mit 1,5 M NaCl in LAT-Assay-Puffer behandelt. Die Abbildung zeigt den Protein- und Aktivitätsverlauf. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei Versuchen.

Abbildung 3.2.20 zeigt deutlich, daß keinerlei Aktivität am Transil[®]-Material band. Das Protein wurde noch vor Beginn der Temperaturerhöhung (1-5) weitgehend eluiert. Bis zu 125 µg/ml Protein sind aber auch noch in den Fraktionen 5-7 zu finden. Die Temperaturerhöhung hatte dagegen keinen Einfluß auf die Aktivität. Diese wurde bis zur Temperaturerhöhung komplett eluiert.

3.2.3.5.2 Elution mittels NaCl-Gradient

Um die Frage zu klären, ob der Detergensanteil des OGP/NaCl-Komplexes eine Bindung verhindert, wurde ein ähnliches Experiment mit pLAT, welche noch keinen Detergenskontakt hatte, durchgeführt.

3 mg ammoniumsulfatpräzipitierte pLAT (1226 nmol/h) wurden in LAT-Assay-Puffer gelöst und mit 1 ml Transilmaterial 30 min äquilibriert. Nach 5x 1 ml Waschschritten mit LAT-Assay-Puffer wurden die NaCl-Konzentration im LAT-Assay-Puffer stufenweise bis 2 M NaCl erhöht.

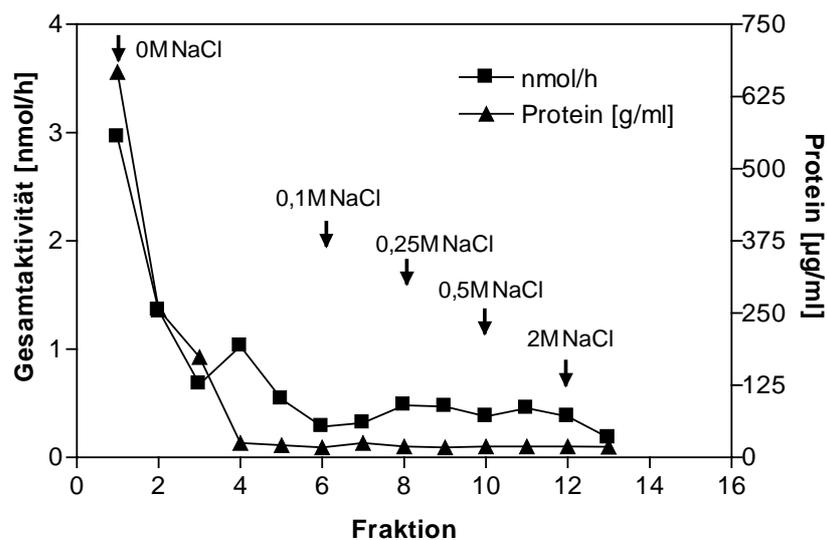


Abb. 3.2.21: Transil[®] - Elution mit NaCl-Stufengradient

Ammoniumsulfat-präzipitierte pLAT wurde unter 0 M NaCl auf die Säule gegeben und mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten stufenweise eluiert. Die Fraktionen 1-5 entsprechen 1 ml und die Fraktionen 6-13 einem Volumen von 0,5 ml. Gezeigt ist ein repräsentativer von drei Versuchen.

Von der aufgetragenen Gesamtaktivität wurden lediglich 9 nmol/h wiedergefunden (7 %). Die Bindung von LAT-Aktivität an Transilmaterial war, wie der Aktivitätsverlauf zeigt, auch ohne Detergensanwesenheit nicht möglich. Wiederholte Versuche, LAT-Aktivität nach dem Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung unter Hochsalz zu applizieren und mit absteigenden Salzgradienten zu eluieren, waren weder mit der pLAT noch dem OGP/NaCl-Überstand erfolgreich.

3.2.3.6 Affinitätschromatographische Ansätze

Vorausgegangene Konkurrenzstudien zeigten, daß Arachidonoyl-CoA mit Palmitinsäure, Palmitoyl-CoA und Ölsäure um das katalytische Zentrum der LAT konkurriert (*Kerkhoff et al., 1998*). Letztere drei wurden daher als Fettsäureliganden eingesetzt und an verschiedene Matrizen gekoppelt.

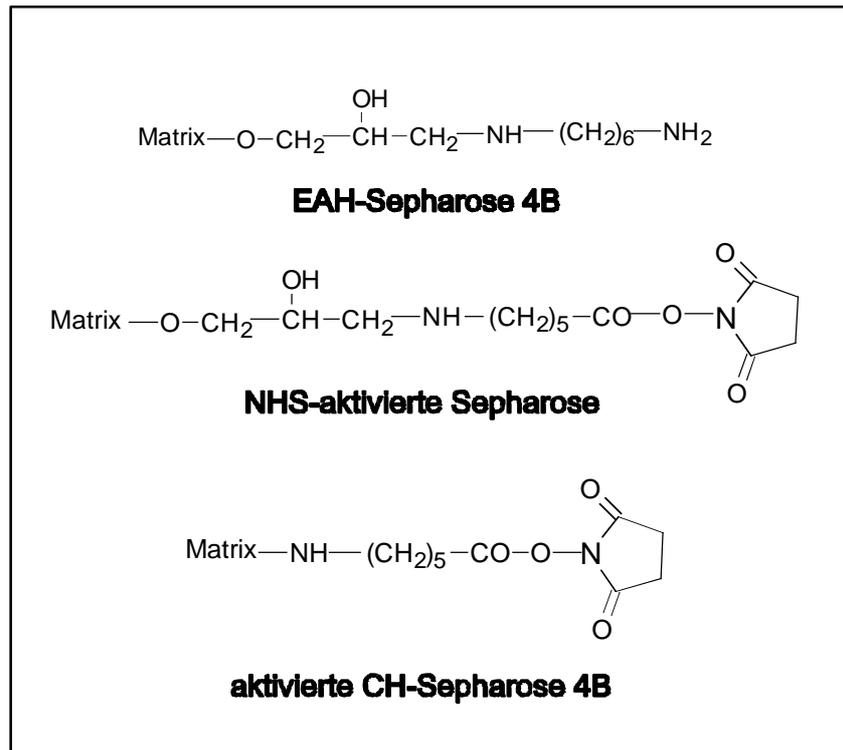


Abb. 3.2.22: Chemische Struktur der unterschiedlichen Säulenmaterialien, an die Fettsäureliganden gekoppelt wurden.

3.2.3.6.1 Palmitinsäure-Sepharose

Die Palmitinsäure-Sepharose wurde, wie unter 2.5.5.5.1 beschrieben, durch carboxyterminale Kopplung von N-Palmitoyloxysuccinimid an freie primäre Aminogruppen der EAH-Sepharose 4B durchgeführt.

Ziel war es zunächst, festzustellen, ob eine Proteinbindung an das Säulenmaterial erfolgte und LAT-Aktivität mittels NaCl-Gradient eluierbar war.

Hierzu wurden 5,3 mg OGP/NaCl-Überstand mit einer Gesamtaktivität von 22184 nmol/h aufgetragen. Es folgte eine Elution mit 0 M, 1 M und 2 M NaCl in LAT-Assay-Puffer. Eine Nachextraktion mit 1 M NaCl und 0,5 % (w/v) OGP in LAT-Assay-Puffer sollte Restprotein von der Säule waschen. Die 4 ml Fraktionen wurden dann auf Aktivität getestet.

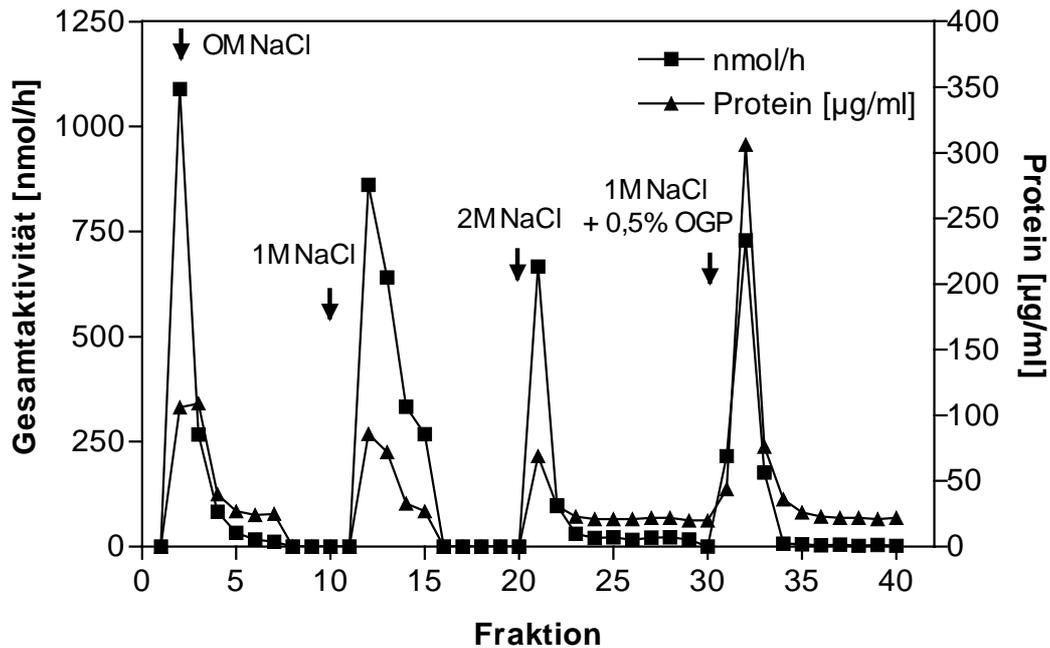


Abb. 3.2.23: Elutionsprofil der Palmitinsäure-Sepharose

OGP/Überstand wurde nach Dialyse gegen LAT-Assay-Puffer aufgetragen und mit einem absteigenden NaCl-Stufengradienten eluiert. Eine Nachextraktion wurde mit 1 M NaCl und 0,5 % (w/v) OGP in LAT-Assay-Puffer durchgeführt. Gezeigt ist das Protein und Aktivitätselutionsprofil. Gezeigt ist ein typisches aus drei Experimenten.

Es wurden 1700 µg Protein aufgetragen, davon konnten 83 % eluiert werden. Das Ausgangsprotein hatte eine Gesamtaktivität von 22185 nmol/h. Davon konnten mit 5672 nmol/h insgesamt 26 % eluiert werden, wobei durch die Nachextraktion mit 1 M NaCl und 0,5 % OGP 20 % der wiedergefundenen Gesamtaktivität eluiert wurden.

Im nächsten Schritt sollte die Selektivität der LAT-Bindung an das Säulenmaterial im Vergleich zu einer nicht-gekoppelten Sepharose ermittelt werden.

Es wurden dazu je 1 mg OGP/NaCl-Überstand mit 4803 nmol/h in LAT-Assay-Puffer auf die Palmitinsäure-Sepharose bzw. auf die Kontrollsäule gegeben. Eluiert wurde nacheinander mit 5 x 3 ml 0 M NaCl, 5x 3 ml 1 M NaCl und 1 M NaCl in 0,5 % (w/v) OGP (alle in LAT-Assay-Puffer). Die 3 ml Fraktionen wurden auf LAT-Aktivität getestet.

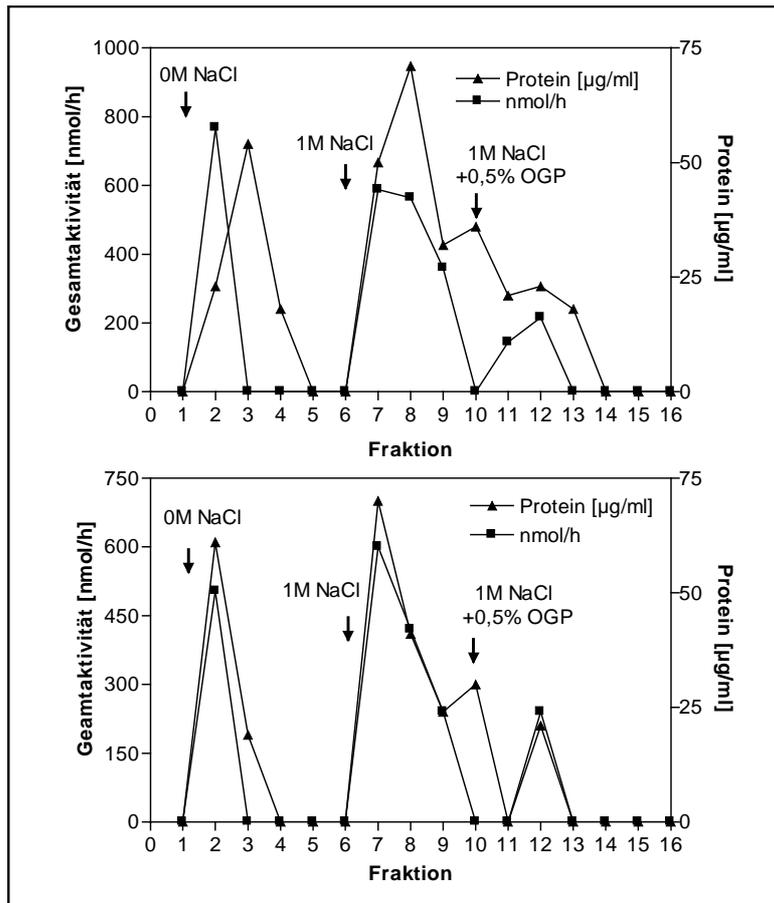


Abb.3.2.24: Vergleich der Palmitinsäure-Sepharose mit einer Kontrollsäule

OGP/NaCl-Überstand wurde in LAT-Assay-Puffer auf beide Säulen gegeben und nacheinander mit 0 M NaCl, 1 M NaCl und 1 M NaCl + 0,5 % (w/v) OGP in LAT-Assay-Puffer eluiert. Jede Fraktion entspricht 3 ml. Gezeigt ist das Protein- und Aktivitätsprofil der Kontrollsäule (oben) im Vergleich zur Palmitinsäure-Sepharose (unten). Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten.

Die Kontrollsäule (oben) zeigte ein nahezu identisches Elutionsprofil der LAT-Aktivität und des Proteins im Vergleich zur Liganden-gekoppelten Säule (unten). Die Kontrollsäule band dabei 75 % des Proteins mit 49 % der aufgetragenen Aktivität. Der Durchlauf (Fraktion 1-6) enthielt 28 % des Proteins mit 21 % der Aktivität. Im Vergleich dazu band auf der Palmitinsäure-Sepharose 56 % des Proteins mit 39 % der Aktivität und der Durchlauf (Fraktion 1-6) enthielt 24 % Protein mit 11 % der aufgetragenen Aktivität.

Die Aktivität bezogen auf die eluierte Proteinmenge (nmol/h/µg) unterschied sich bei beiden Säulen nicht. Eine besondere Spezifität der Palmitinsäure-Sepharose gegenüber der Kontrollsäule war somit nicht erkennbar.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die LAT-Aktivität mit einem feineren NaCl-Gradienten selektiver zu eluieren.

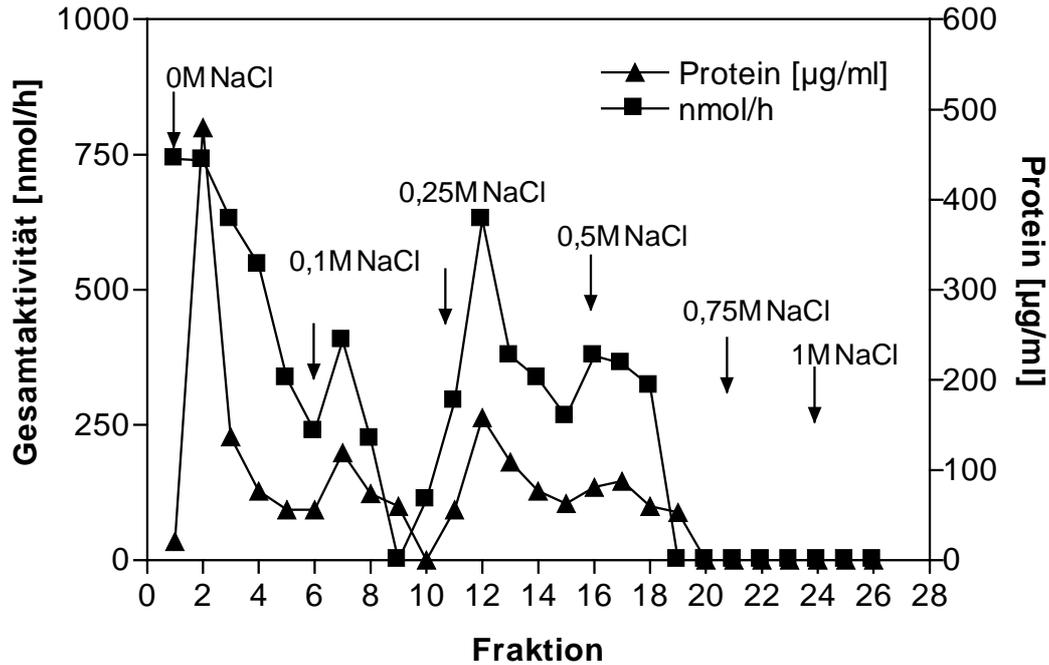


Abb.3.2.25: Feinerer NaCl-Stufengradient mit der Palmitinsäure-Sepharose

Der OGP/NaCl-Überstand (1,7 mg) wurden auf die Säule gegeben und mit einem Stufengradienten (0 M; 0,1 M; 0,25 M; 0,5 M; 0,75 M und 1 M NaCl) in 3,5 ml Fraktionen eluiert. Gezeigt sind das Protein- und Aktivitätselutionsprofil. Gezeigt ist ein typisches von drei Experimenten.

Von 1,7 mg Protein wurden 885 µg in den Fraktionen 7-26 detektiert. Auf die Säule hatten somit 52 % des Proteins gebunden. Die eluierte Aktivität entsprach 41 % der aufgetragenen Aktivität. Die Trennung der LAT-Aktivität vom Hauptprotein konnte auch hier nicht verbessert werden. Mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen konnten hier ohne Detergens schon 2-3 Aktivitätspeaks getrennt werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden zum Teil auf einen SDS-Gel aufgetrennt und eine Fraktionsauswahl wurde des weiteren mit dem Photoaffinitätsmarker markiert.

Für das SDS-Gel wurden je 100 µl der Fraktionen nach *Wessel & Flügge (1983)* gefällt, zunächst in 40 µl Laemmli-Puffer 5min bei 95°C erhitzt und dann direkt auf das Gel aufgetragen.

An den Proteinbanden in Abb. 3.2.26 ist erkennbar, daß im Durchlauf der Großteil des Proteins auftaucht. Einige Banden (z. B. 60 und 77 kDa) zeigen sich über das ganze Elutionsprofil verteilt. Nur in wenigen Fraktionen scheint eine selektive Anreicherung von Protein zu erfolgen. Dies ist der Fall in Bahn 6 (25, 48, 80 und 85 kDa) in Bahn 7 (50 und 60 kDa) und in 11 (30, 50 und 48 kDa). In Fraktion 15 werden die Banden 48, 50 sowie 55 und 60 angereichert. Bahn 6 entspricht der 0,1 M NaCl Fraktion 2 und zeigt ein LAT-Aktivitätsmaximum. Bahn 11 hat als Fraktion 0,25 M NaCl Fraktion 2 ebenfalls das

Maximum der Aktivität. Die Bahn 15 zeichnet sich auch durch die höchste LAT-Aktivität aus (0,5 M NaCl Fraktion 2).

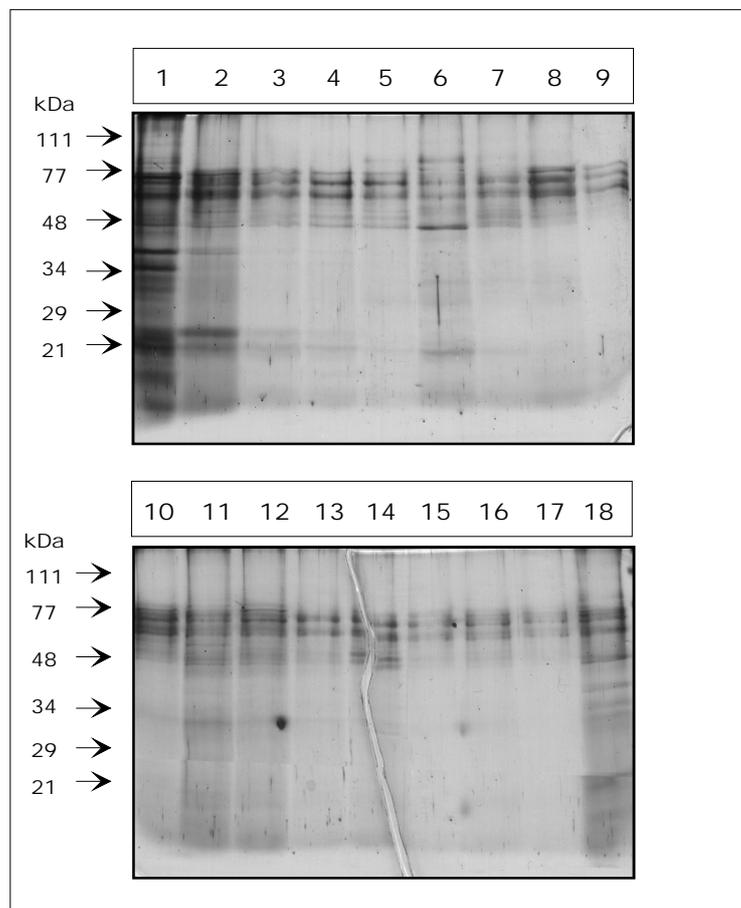


Abb. 3.2.26: Laemmli-SDS-Gel

100 μ l der jeweiligen Fraktion wurden gefällt und auf einem 12,5 % Trenngel getrennt. Folgende Fraktionen entsprechen den Fraktionen aus Abb. 3.2.25: 1-4 = 0 M NaCl; 5-9 = 0,1 M NaCl; 10-13 = 0,25 M NaCl und 14-17 = 0,5 M NaCl. Nummer 18 entspricht 10 μ g OGP/NaCl-Überstand.

Die gemeinsam angereicherte Bande der Bahnen 6, 7, 11 und 15 ist eine Bande mit einem MW von 48 kDa.

Einige aktive und nichtaktive Fraktionen aus 3.2.25 wurden im Folgenden mit ASO-CoA markiert. Hierzu wurden 100 μ l der entsprechenden Fraktion mit 250 μ M ASO-CoA \pm Arachidonyl-CoA (ACoA) inkubiert und dann nach *Wessel&Flügge (1983)* gefällt und auf einem 12,5 % Trenngel aufgetrennt.

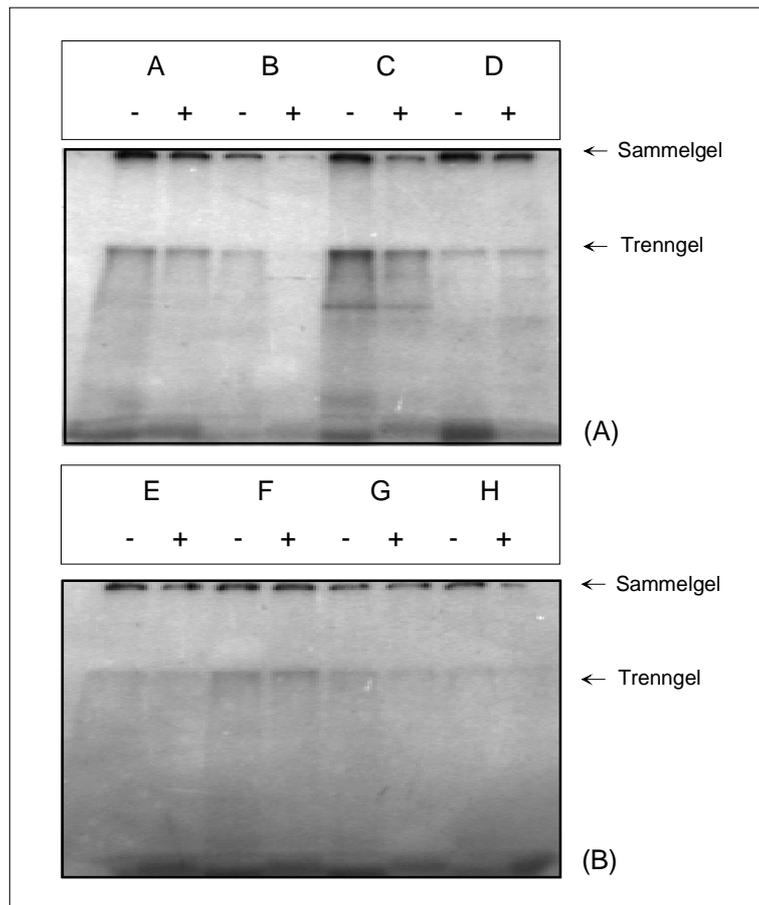


Abb.: 3.2.27: Photoaffinitätsmarkierung von Palmitinsäure-Fractionen

Fractionen aus Abb.3.2.25 wurden mit 250 μM ASO-CoA und zur Konkurrenz mit $\pm 100 \mu\text{M}$ ACoA inkubiert. Nach 1 min UV-Bestrahlung wurden die Proteine auf einem SDS-Gel getrennt (12,5% Trenngel) und CBB-gefärbt. Markierte Proteine wurden auf der Autoradiographie sichtbar. Die Fractionen wurden wie folgt aufgetragen: A= 0 M NaCl/Fraktion1, B= 0,1 M NaCl/1, C= 0,1 M NaCl/5, D= 0,25 M NaCl/2, E= 0,25 M NaCl/ 5, F= 0,5 M NaCl/1, G= 0,5 M NaCl/2 und E= 0,5 M NaCl/5.

Die mit ASO-CoA versehenen Fractionen weisen nur wenig markiertes Protein im Trenngel auf. In den Geltaschen zeigt sich in nahezu allen Bahnen deutlich markiertes Protein, daß sich bei Zugabe von ACoA mehr oder weniger gut verdrängen ließ. Dies deutet daraufhin, daß sich große Proteinaggregate offenbar in der Geltasche und z.T. auch an der Grenze zwischen Sammelgel und dem 12,5 % Trenngel befinden. Lediglich in C (0,1 M NaCl, Fraktion 5) wurden eine 25 und 60 kDa Proteinbande sichtbar, in der das ACoA den Photoaffinitätsmarker verdrängt hatte.

Für eine weitere Betrachtung waren die markierten Banden nicht interessant, da diese nicht in den Fractionen mit den Maximalaktivitäten wiederzufinden waren.

Weitere Versuche mit der Palmitinsäure-Sepharose zur Verbesserung der Zugänglichkeit von Bindungsstellen des OGP/NaCl-Komplex für den Liganden Palmitinsäure wurden mit CHAPS im Verhältnis 1:10 durchgeführt. Das Ergebnis war eine vollständige Unterdrückung der Bindung an die Säule. Aktivität und das komplette Protein wurden nur als Peak im Durchlauf gemessen.

3.2.3.6.2 Palmitoyl-CoA-Agarose

Die Alternative zur Palmitinsäure-Sepharose stellte das an Agarose gekoppelte Palmitoyl-Coenzym A dar. Dieses käufliche Material wurde in 1 ml Säulen verwendet.

Zuerst wurde das Säulenmaterial auf seine Fähigkeit LAT-Aktivität zu binden getestet. Dazu wurden 1 mg OGP/NaCl-Überstand in LAT-Assay-Puffer auf 0,5 % (w/v) OGP auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann mit 7x 1ml LAT-Assay-Puffer + 0,5 % (w/v) OGP gespült, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Danach erfolgte die Elution mit 5x 2 ml 1 M NaCl + 0,5 % (w/v) OGP in LAT-Assay-Puffer, gefolgt von 5x 2 ml 2 M NaCl + 0,5 % (w/v) OGP in LAT-Assay-Puffer. Alle Fraktionen wurden im LAT-Assay auf Aktivität getestet.

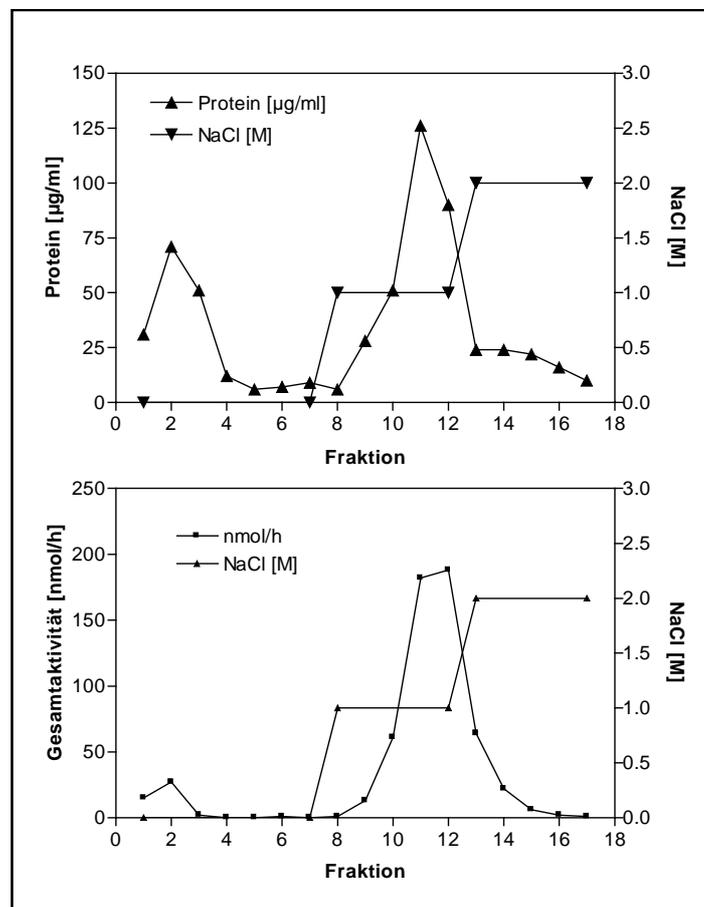


Abb. 3.2.28: Bindung von LAT-Aktivität an Palmitoyl-CoA-Agarose

OGP/NaCl-Überstand wurde auf 0,5 % (w/v) OGP eingestellt und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte, nach einem Waschschritt mit 7 ml LAT-Assay-Puffer, mit 5 ml 1 M NaCl und 5 ml 2 M NaCl in LAT-Assay-Puffer. Alle Puffer enthielten 0,5 % (w/v) OGP. Die Fraktionen 1-7 entsprechen je 1 ml, die Fraktionen 8-17 2 ml. In (A) ist das Protein- und in (B) das Aktivitätselutionsprofil zu sehen. Gezeigt ist ein typisches aus drei Experimenten.

Die Abb. 3.2.28 zeigt eine deutliche Protein- und Aktivitätsbindung auf der Säule. Von 1 mg aufgetragenem Protein mit einer Gesamttaktivität von 15107 nmol/h befanden sich 187 µg (19 %) im Durchlauf mit insgesamt 50 nmol/h, während 794 µg (79 %) mit einer Aktivität von 545 nmol/h (4 %) auf der Säule gebunden hatten und eluiert werden konnten. Eine

Verschiebung des Aktivitätspeaks im Vergleich zum Proteinpeak konnte in dieser Form nicht erreicht werden.

Um eine selektive Elution von LAT-Aktivität erreichen, wurden Experimente mit einem Detergensgradienten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 1 mg OGP/NaCl-Überstand ohne OGP auf eine mit LAT-Assay-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und eines Gradientenmischers wurde über ein Volumen von 20 ml ein linearer OGP-Gradient (in LAT-Assay-Puffer) bis zu einer finalen Konzentration von 5 % (w/v) OGP erzeugt. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler automatisch gesammelt und die LAT-Aktivität gemessen.

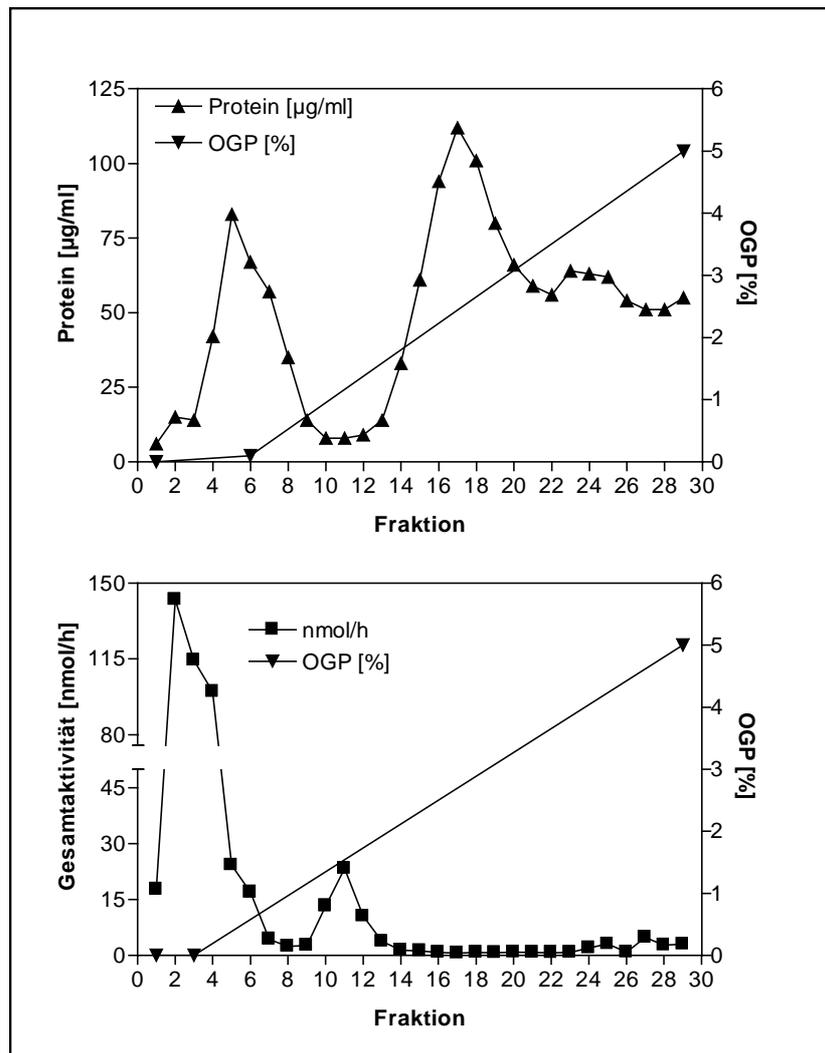


Abb. 3.2.29: Palmitoyl-CoA-Agarose unter OGP-Gradient

1 mg dialysierter OGP/NaCl-Überstand wurde ohne OGP auf eine mit LAT-Assay-Puffer äquilibrierte Säule gegeben und nachfolgend mit einem linearem OGP-Gradienten (0-5 % w/v) eluiert. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 690 µl. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus sieben Versuchen.

Von 1 mg aufgetragenem Überstand mit einer Gesamtaktivität von 16141 nmol/h wurden im Durchlauf (bis Fraktion 9, gemessen nach dem Proteinprofil) 24 % Protein mit 3 % der Gesamtaktivität gefunden, während durch den OGP-Gradienten 79 % des Proteins mit

lediglich 0,5 % der aufgetragenen Aktivität eluiert wurden. Dennoch wurde eine signifikante Abtrennung der LAT-Aktivität vom Hauptprotein erreicht.

Zur Beurteilung der Trennungsqualität wurden 100 µl der Fraktionen 3,4 und 8-19 nach *Wessel & Flügge (1983)* gefällt und auf einem 12,5 % Trenngel in 40 µl Laemmli-Puffer aufgetragen.

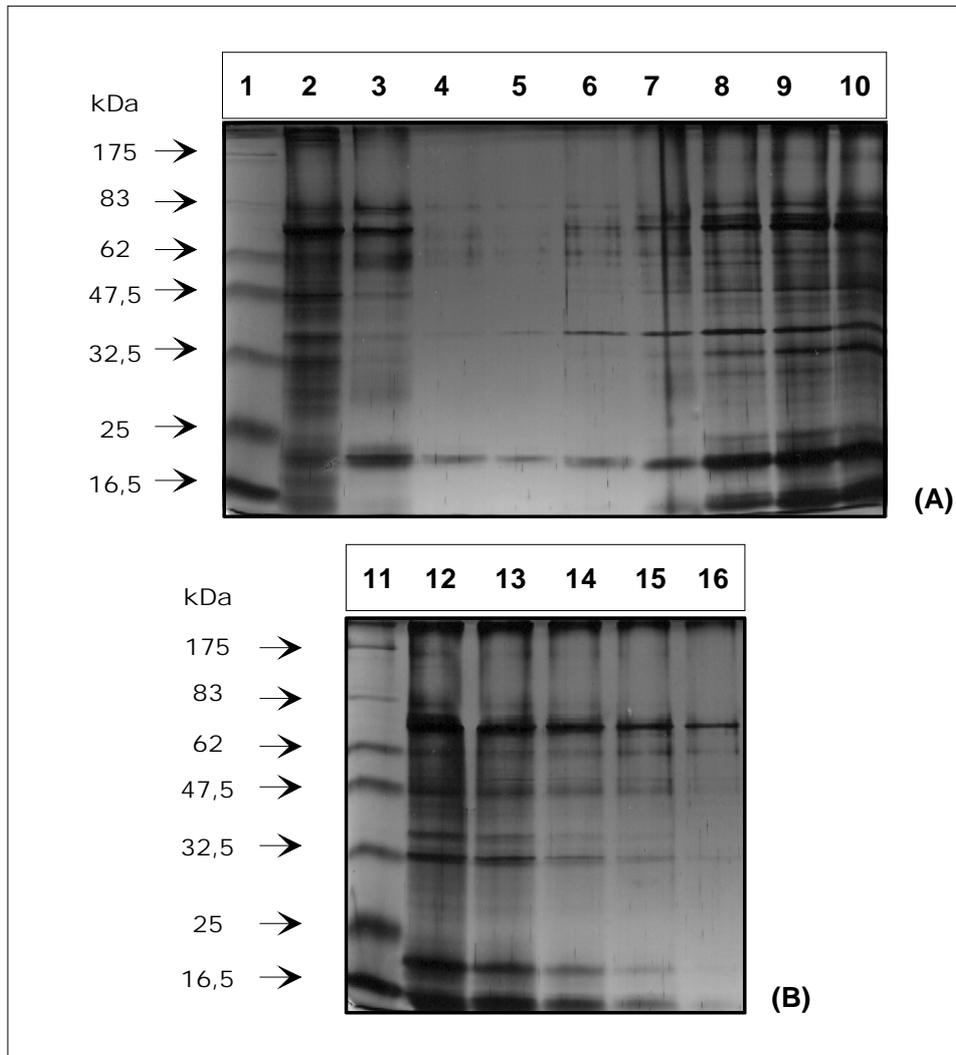


Abb. 3.2.30: SDS-Gel: Palmitoyl-CoA-Agarose Fraktionen nach OGP-Gradient

100 µl der Fraktionen 3,4 und 8-19 aus Abb.3.3.29 wurde gefällt und auf ein 12,5 % Trenngel getrennt. Es ist nur das Trenngel zu sehen. In (A) Bahn 1 und (B) Bahn 11 ist der Marker zu erkennen. Die Reihenfolge 2-10 entspricht der Folge 3,4 und 8-14 und die Bahnen 12-16 den Fraktionen 15-19. Aktive Fraktionen sind 6,7 und 8.

Das Gel zeigt einen deutlich unterschiedlichen Verlauf des Proteins. Die interessanten Bahnen sind 6-8, da in Bahn 7 die Hauptaktivität liegt. Als einzig auffallende Bande im Vergleich der weniger oder nicht aktiven Fraktionen um Bahn 7 erscheint im Silbergel eine 65 kD Bande. Die Isolation einer Solchen ist durch die Nähe weiterer Banden kaum möglich, zumal für eine Mikrosequenzierung coomassiefärbbare Gelbanden benötigt wurden.

Die Auftrennung im eindimensionalen SDS-Gel ist hier auch limitiert, so daß für diese Zwecke die zweidimensionale Gelelektrophorese etabliert wurde (s. 2.5.7.1.3).

Die Hauptschwierigkeit stellte im Verlauf vieler Palmitoyl-CoA-Agarose-Läufe die Ermittlung der genauen Aktivitätsposition dar und verhinderte die vollständige Automatisierung.

3.2.3.6.3 Kopplung von 18-Amino-Ölsäure an aktivierte CH-Sepharose 4B

18-Amino-Ölsäure wurde, im Gegensatz zur carboxyterminalen Kopplung der Palmitinsäure, über die ω -Aminogruppe an aktivierte CH-Sepharose 4B gekoppelt. Diese Matrix besitzt als Abstandhalter sechs C-Atome und einen reaktiven Ester für die kovalente Bindung von Liganden mit primären Aminogruppen. Diese Reaktion ist sehr spezifisch, und andere funktionelle Gruppen müssen während der Kopplung nicht geschützt werden. Der aktive Ester kann von der unprotonierten Form der primären Aminogruppe angegriffen werden und so zur kovalenten Verknüpfung führen. Parallel wurde eine Kontrollsäule ohne Liganden identisch behandelt.

Zu Beginn sollte ermittelt werden, inwieweit eine Proteinbindung erfolgt und ob sich Kontroll- und 18-Amino-Ölsäure-Sepharose in der Bindung von LAT-Aktivität unterscheiden.

Auf beide Säulen wurde hierzu 1 mg mit 3012 nmol/h OGP/NaCl-Überstand in LAT-Assay-Puffer aufgetragen. Die Säulen wurden zuvor mit LAT-Assay-Puffer äquilibriert. Das NaCl des folgenden, aufsteigenden Stufengradienten wurde in LAT-Assay-Puffer gelöst. Es wurden ein 1 ml Durchlauf und dann 3 x 3ml Fraktionen mit 0 M NaCl aufgefangen. Alle weiteren Fraktionen hatten ein Volumen von 2 ml.

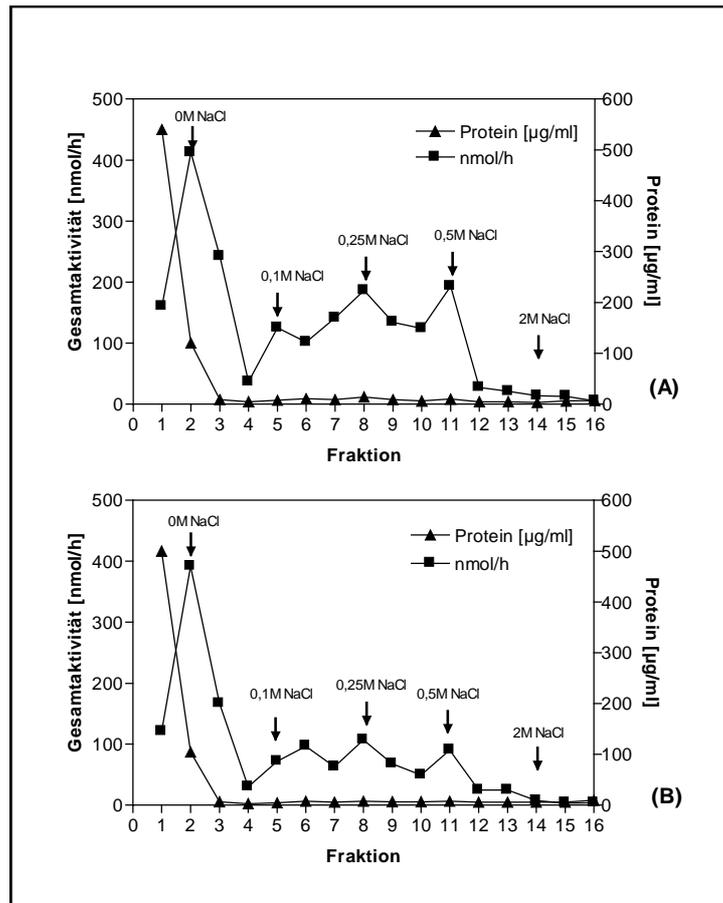


Abb. 3.2.31: Vergleich der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose mit der Kontrollsäule

OGP/NaCl-Überstand in LAT-Assay-Puffer wurde auf die 18-Amino-Ölsäure-Sepharose (A) und zu Vergleich auf die Kontrollsäule (B) gegeben. Es wurde mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Abgebildet sind in (A) und (B) jeweils das Protein- und Aktivitätselutionsprofil. Gezeigt ist ein typischer von drei Versuchen.

Der Vergleich beider Säulen zeigt, daß in beiden Fällen Aktivität gebunden wurde. Beide Durchläufe enthielten mit 74 % (A) und 85 % (B) das meiste Protein. Die gefundene Aktivität war hier vergleichsweise gering. Von den Säulen konnten 150 µg (15 %, (A)) und 136 µg (14 %, (B)) Protein eluiert werden mit einer Aktivität von 1085 nmol/h (36 % (A)) und 612 nmol/h (20 % (B)). Somit gibt es keine spezifische Bindung über den Liganden, aber offenbar eine unterschiedliche Affinität zum Säulenmaterial. Die Bindung von LAT-Aktivität an die 18-Amino-Ölsäure liegt um 16 % höher als an die Kontrollsäule.

Es wurde weiterhin versucht, eine selektivere Bindung von aktiven LAT-Protein an die 18-Amino-Ölsäure zu erreichen. Die Bindung von Begleitproteine sollte durch die Anwesenheit von 0,5 % (w/v) OGP in allen Puffern verringert werden.

Dazu wurden 1,1 mg OGP/NaCl-Überstand mit einer Gesamtaktivität von 3300 nmol/h in LAT-Assay-Puffer unter 0,5 % (w/v) OGP aufgetragen und mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten (0 M; 0,5 M; 1 M und 4 M) eluiert.

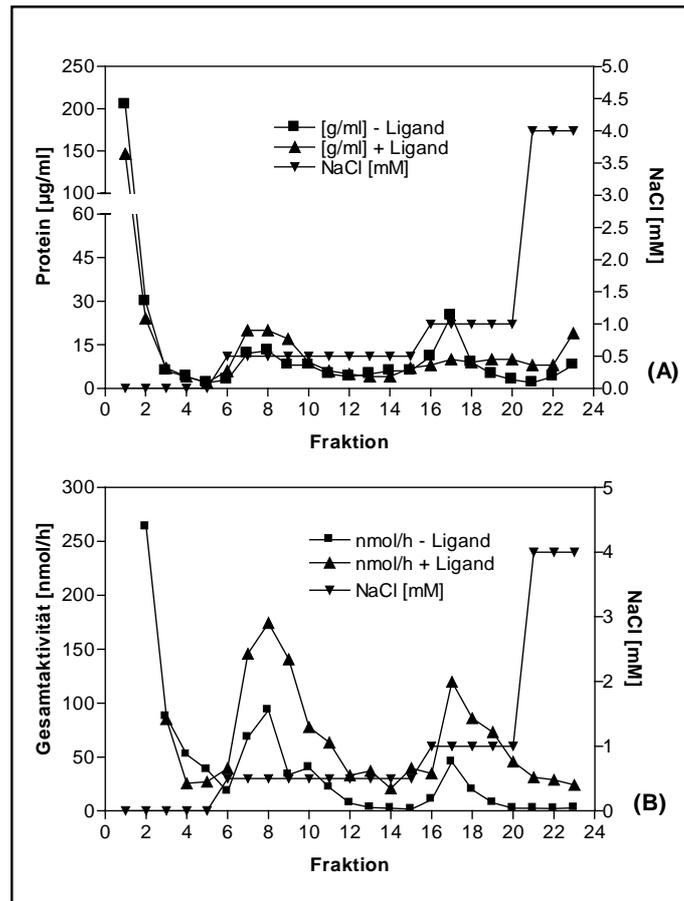


Abb. 3.2.32: 18-Amino-Ölsäure-Sephrose unter 0,5 % (w/v) OGP

OGP/NaCl-Überstand wurde in LAT-Assay-Puffer unter 0,5 % (w/v) OGP auf die 18-Amino-Ölsäure und die Kontrollsäule aufgetragen. In (A) ist die Elution des Proteins und in (B) die der LAT-Aktivität gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten.

In der Abb. 3.2.32 wird deutlich, daß die Bindung von LAT-Aktivität auch unter Anwesenheit von OGP in allen Puffern noch an beide Säulen erfolgt. Im Vergleich zur Bindung ohne OGP konnte die gebundene Aktivität an der Kontrollsäule um 50 % verringert werden. Die Bindung von LAT-Aktivität an die 18-Amino-Ölsäure-Sephrose blieb konstant und lag im Vergleich zur Kontrolle insgesamt um ca.70% höher.

Als ein Problem erwies sich die Trennung der Aktivität vom Hauptprotein. Daher wurden weitere Versuche mit anderen Gradienten durchgeführt. Mit einem KCl-Gradienten (0,25-2 M) sollte der Aktivitätspeak gestaucht werden. Der Aktivitätspeak konnte jedoch auf diese Art nur verbreitert werden. (Daten nicht gezeigt.)

Mit einem Calcium-Gradienten sollte die Wirkung von zweiwertigen Ionen untersucht werden. Eine Konzentrationsabhängigkeit erwies zuvor die starke Abhängigkeit der LAT-Konzentration von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen.

Ca ²⁺ -Konzentration [mM]	Gesamtaktivität [nmol/h]
0	13
5	9
10	9
100	6
250	4
500	1
2000	0,1

Tab.6: Ca²⁺-Empfindlichkeit der LAT-Aktivität

5 µg OGP/NaCl-Überstand wurden in LAT-Assay-Puffer (100 µl Ansatz) mit 0-2 M Calciumchlorid versetzt und die Aktivität sofort im LAT-Assay gemessen.

Schon mit 100 mM Calcium wurden 50 % der Ausgangsaktivität zerstört. Die Verwendung eines Calcium-Gradienten erwies sich damit als wenig brauchbar. Aktives LAT-Protein konnte nicht eluiert werden. Lediglich der Durchlauf zeigte Aktivität (Daten nicht gezeigt).

3.2.3.6.4 Kopplung von 18-Amino-Ölsäure an NHS-aktivierte Sepharose

Es stellte sich die Frage, ob ein anderes Säulenmaterial (mit einem modifizierten Abstandhalter) mit 18-Amino-Ölsäure als Ligand zu besseren Trennergebnissen führen würde.

HiTrap NHS-aktivierte Sepharose-Fertigsäulen sind bei Amersham Pharmacia Biotech käuflich erwerbbar. Es handelt sich um Sepharose-Matrizen, die durch Veresterung mit N-hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert wurden. 18-Amino-Ölsäure kann wie an die aktivierte CH-Sepharose 4B über die Aminogruppe gekoppelt werden. Der gebundene Ligand ist in diesem Fall von der Sepharose-Matrix durch einen hydrophilen Spacer von 10 Atomen Länge getrennt.

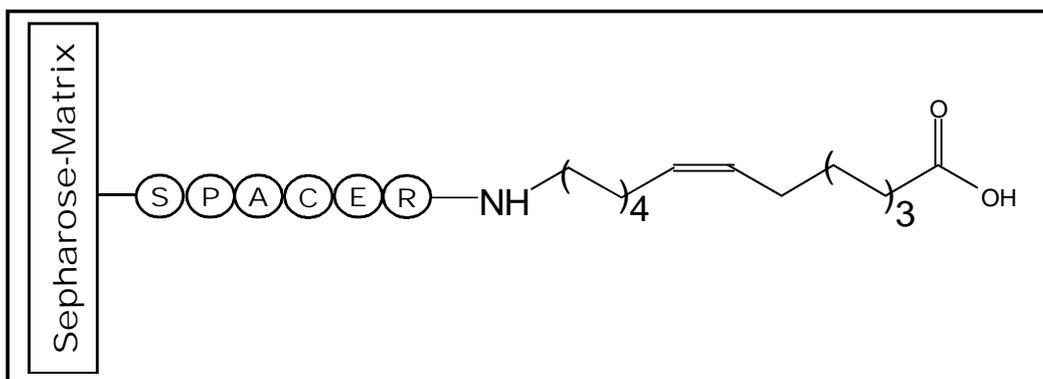
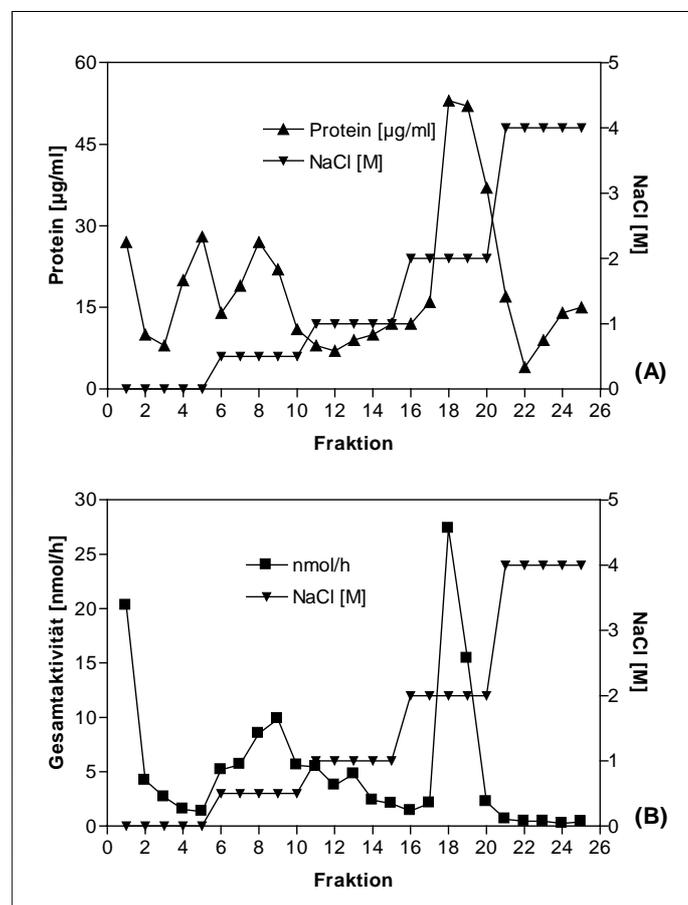


Abb.3.2.33: Kopplung der 18-Amino-Ölsäure an NHS-aktivierte Sepharose

Die HiTrap-Matrix zeichnet sich durch die besonders hohe Kopplungseffizienz aus. Das Säulenmaterial wurde in der 1 ml und auch in einer 5ml Variante gekoppelt. Letztere eignet sich auch zur Verwendung an einer FPLC-Anlage.

Nach erfolgter Ligandenkopplung bzw. Herstellung der Kontrollsäule stellte sich die Frage, ob eine spezifische Bindung über den Liganden oder unspezifische Bindung über die Matrix inklusive Abstandhalter erfolgt. Beide Säulen wurden vergleichend untersucht.

Auf die ligandengekoppelte Säule wurden 868 μg OGP/NaCl-Überstand mit 9634 nmol/h in LAT-Assay-Puffer aufgetragen. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die Probe vorher auf 0,5 % (w/v) OGP eingestellt. Die Elution erfolgte mit 6 x 2 ml 0M NaCl, 5 x 2 ml 0,5 M NaCl, 5 x 2 ml 1 M NaCl, 5 x 2 ml 2 M NaCl und 5 x 2 ml 4 M NaCl in LAT-Assay-Puffer mit 0,5 % (w/v) OGP.



3.2.34: 18-Amino-Ölsäure an NHS-aktivierter Sepharose als Affinitätsmatrix

OGP/NaCl-Überstand wurde in LAT-Assay-Puffer unter 0,5 % (w/v) OGP aufgetragen und mit einem aufsteigenden NaCl-Stufengradienten eluiert. Jede Fraktion entspricht 2ml. In (A) ist das Protein- und in (B) das Aktivitätselutionsprofil zu sehen. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf Experimenten.

Das Proteinelutionsprofil zeigt neben dem Durchlauf (11 % des aufgetragenen Proteins) einen breiten Peak der mit 0,5 M NaCl und eine weiteren breiten Peak, der mit 2 M NaCl eluiert wurde. Das eluierte Protein betrug 42 % des aufgetragenen Proteins. Die Aktivität wurde z. T.

unter 0,5 M und 1 M NaCl, zum größten Teil aber unter 2 M NaCl heruntergewaschen. Hierdurch konnten aber nur 1 % der Originalaktivität eluiert werden.

Zum Vergleich wurden 868 μg OGP/NaCl-Überstand mit 9634 nmol/h unter gleichen Bedingungen auf die Kontrollsäule gegeben.

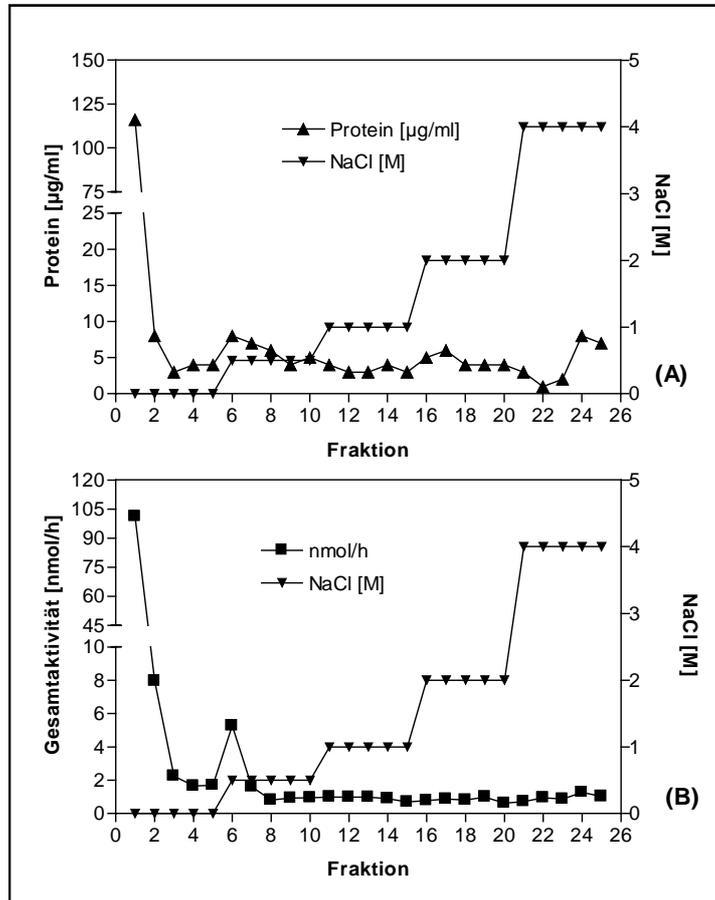


Abb.3.2.35: NHS-aktivierte Sepharose ohne Ligand

OGP/NaCl-Überstand wurde in LAT-Assay-Puffer unter 0,5 % (w/v) OGP aufgetragen und mit einem aufsteigenden NaCl-Stufengradienten eluiert. Jede Fraktion entspricht 2 ml. In (A) ist das Protein- und in (B) das Aktivitätselutionsprofil zu sehen. Gezeigt ist ein typisches aus drei Experimenten.

Der Durchlauf zeigte den größten Proteinanteil. Ein singulärer Proteinpeak konnte nicht eluiert werden. Am meisten Protein wurde unter 0,5 M NaCl eluiert. Im Verlauf der LAT-Aktivität zeigte sich 1 % der aufgetragenen Aktivität im Durchlauf (bis Fraktion 5). Lediglich 0,2 % der LAT-Aktivität konnten im Eluat gefunden werden. Mit 0,5 M NaCl konnte dabei die meiste Aktivität von der Säule gewaschen werden.

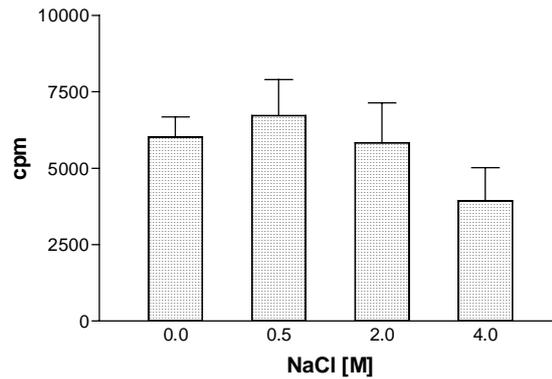


Abb.3.2.36: NaCl-Abhängigkeit der LAT-Aktivität

1 µg OGP/NaCl-Überstand wurden in einem 100 µl Ansatz mit 0-4 M NaCl versetzt und direkt im LAT-Assay auf Aktivität gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD aus Dreifachwerten zweier Versuche.

Es zeigte sich, dass 4 M NaCl die LAT-Aktivität um bis zu 40 % hemmen!

In weiteren Experimenten wurde daher der NaCl-Gradient auf zwei Stufen (1 M und 2 M) begrenzt. Die Elution mit 2 M NaCl erfolgte mit 10 x 2 ml, um spätere Protein- und Aktivitätselution zu betrachten. Auf die ligandengekoppelte Säule wurden 884 µg OGP/NaCl-Überstand unter 0,5 % (w/v) OGP aufgetragen und mit 6 x 2 ml 0 M NaCl, 5 x 2 ml 1 M NaCl und 10 x 2 ml 2 M NaCl in LAT-Assay-Puffer mit 0,5 % (w/v) OGP eluiert.

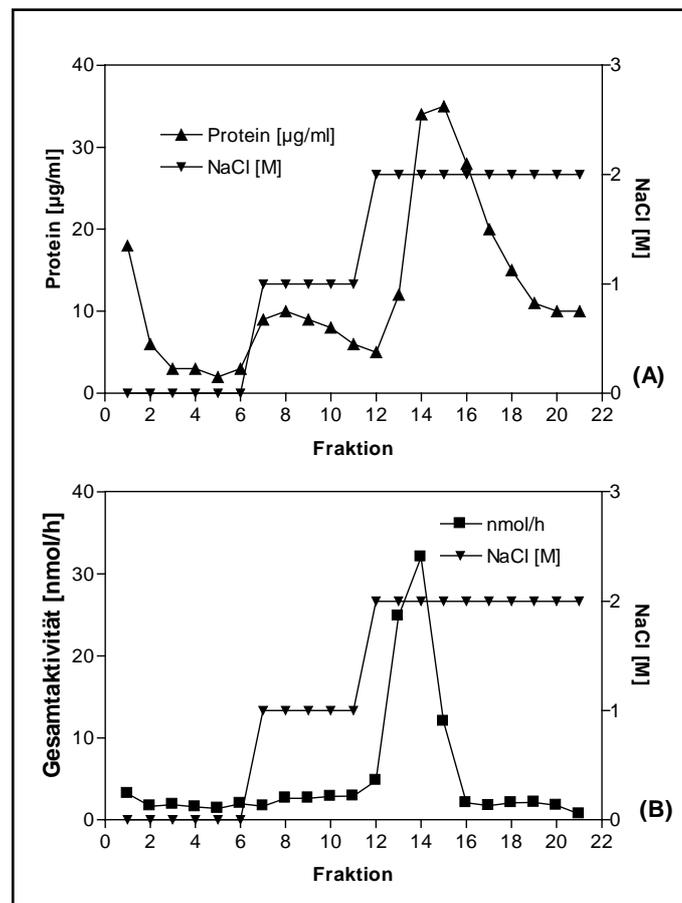


Abb. 3.2.37: 18-Amino-Ölsäure-Sepharose

OGP/NaCl-Überstand wurde unter 0,5 % (w/v) OGP aufgetragen und mit einem NaCl-Stufengradienten eluiert. In (A) ist das Protein- und in (B) das Aktivitätsprofil der Elution zu sehen. Es ist eins von fünf typischen Experimenten abgebildet.

Wie sich zeigte, war das Protein im Durchlauf, in einem Peak bei 1 M NaCl und in einem weiteren bei 2 M NaCl zu finden. Das Eluat enthielt 50 % des aufgetragenen Proteins. Die Aktivität war auf den zweiten Peak bei 2 M NaCl beschränkt, zeigte aber nur 1 % der Originalaktivität. Die Hauptaktivität zeigte sich in Fraktion 13 und 14, das Hauptprotein fand sich bei Fraktion 14 bis 18 wieder.

Es war daher interessant, die entsprechenden Fraktionen auf einem Laemmli-SDS-Gel zu trennen. Aus der Abb. 3.2.37 wurden die Fraktionen 1 (0 M/Fraktion 1), 5 (0 M/5), 8 (1 M NaCl/2), 12 (2 M NaCl/1), 13-15 (2 M NaCl/2 bis 3), 17 (2 M NaCl/6) und 21 (2 M NaCl/10) dialysiert und je 100 µl nach *Wessel & Flügge (1983)* gefällt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 12,5 % Trenngel.

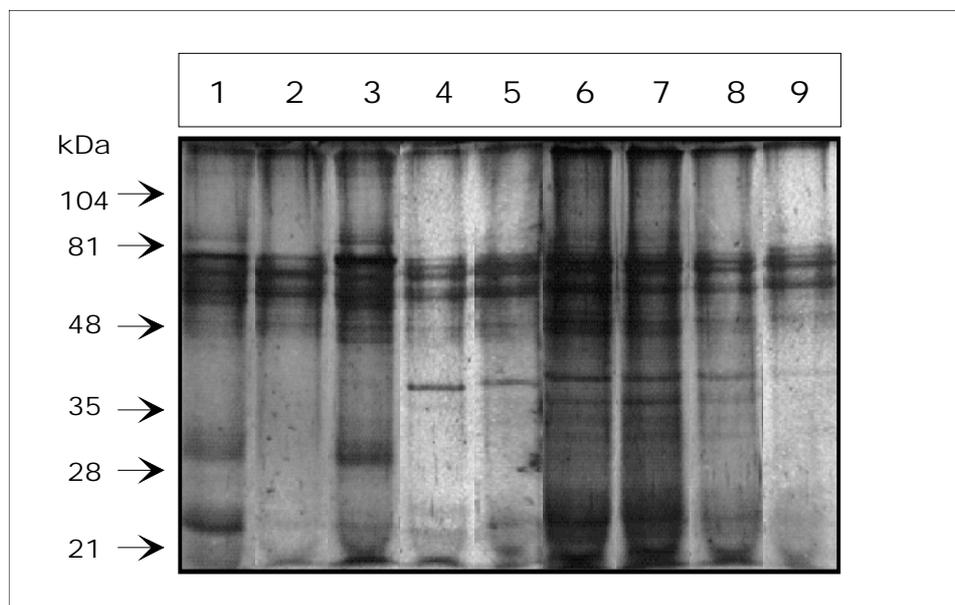


Abb. 3.2.38: Laemmli-SDS-Gel mit Fraktionen der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose

In der Reihenfolge Bahn 1-9 wurden die Fraktionen 1 (0 M/Fraktion 1), 5 (0 M/5), 8 (1 M NaCl/2), 12 (2 M NaCl/1), 13-15 (2 M NaCl/2 bis 3), 17 (2 M NaCl/6) und 21 (2 M NaCl/10) aus der Abb. 3.2.37 nach Fällung auf einem 12,5 % Trenngel getrennt. Das Gel wurde im Anschluß silbergefärbt.

Das Gel zeigt deutlich die Anreicherung von Proteinen in verschiedenen Eluaten. Mit 1 M NaCl konnten (Bahn 3) ein 30, 48 und 85 kDa Protein stark angereichert werden. Mit 2 M NaCl konnte deutlich (Bahn 4, geringe LAT-Aktivität) eine 40 kDa Bande eluiert werden. Die Bahnen 5 und 6 zeigen die höchste Aktivität. Eine auffällige Anreicherung von Proteinbanden im Vergleich zu den Bahnen 4 oder 7 ist schwer zu erkennen. In Bahn 6 wurden ein 35, 55 und 85 kDa Protein angereichert sowie einige höhermolekulare Banden. Der Großteil der schwer zu identifizierenden Anreicherungen liegt im Bereich 41-90 kDa. Mit einem herkömmlichen 12,5 % Gel ist eine bessere Auflösung nicht zu erwarten. Zu diesem Zweck wurde die 2D-Elektrophorese etabliert (s. 2.5.7.1.3).

Im weiteren Verlauf wurde versucht, durch wiederholte Säulenläufe und selektives Poolen der Fraktionen 13 und 14 (Konzentration der Fraktionen über Millipore-Konzentratoren) eine mögliche Anreicherung von LAT-Protein zu erzielen. Zur Betrachtung des höhermolekularen

kDa-Bereichs wurde die Elektrophorese entsprechend länger durchgeführt unter Verwendung hochmolekularer Standards (45-200 kDa).

Das Konzentrat (11 µg) dieser beiden 18-Amino-Ölsäure-Sepharose-Fractionen wurde im Vergleich zum OGP/NaCl-Überstand (11 µg) auf einem 12,5 % SDS-Gel getrennt.

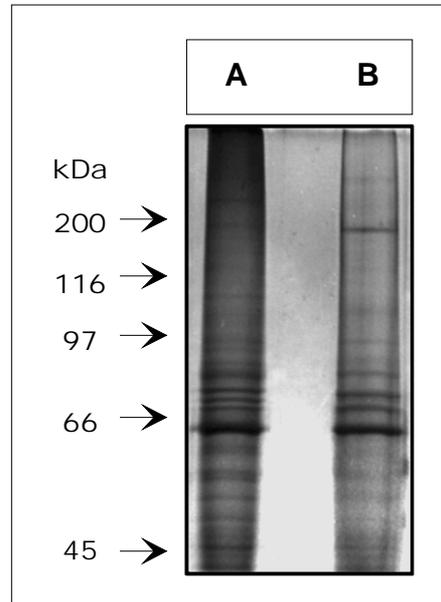


Abb. 3.2.39: Vergleich von OGP/NaCl-Überstand und Konzentrat der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose

Je 11 µg OGP/NaCl-Überstand und Konzentrat der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose wurden auf einem 12,5 % SDS-Gel getrennt. A zeigt den OGP/NaCl-Überstand und B das Konzentrat.

Die Proteinbanden der beiden Fraktionen zeigen sich sehr ähnlich. In A fallen im Bereich 90 – 200 kDa einige Banden auf, während in B nur eine 160 kDa Bande hervorsticht. Diese Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten und zur Mikrosequenzierung im Gel verdaut (s.3.4.1).

OGP-Stufengradient auf der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose

Die Erfahrung mit der Palmitoyl-CoA-Agarose zeigte die graduelle Erhöhung der Detergengkonzentration als erfolgreiches Trennprinzip. Ein OGP-Stufengradient wurde daher auch auf der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose (NHS-aktiviert) getestet.

1mg OGP/NaCl-Überstand mit 21300 nmol/h wurden in LAT-Assay-Puffer auf die Säule gegeben und nacheinander mit 6 x 1 ml LAT-Assay-Puffer, 3 x 1 ml 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 5 % sowie 0,5 % (w/v) OGP + 2 M NaCl und nochmals 0 M NaCl in LAT-Assay-Puffer eluiert. Im letzten Elutionsschritt sollte mit 2 M NaCl Restprotein von der Säule gewaschen werden.

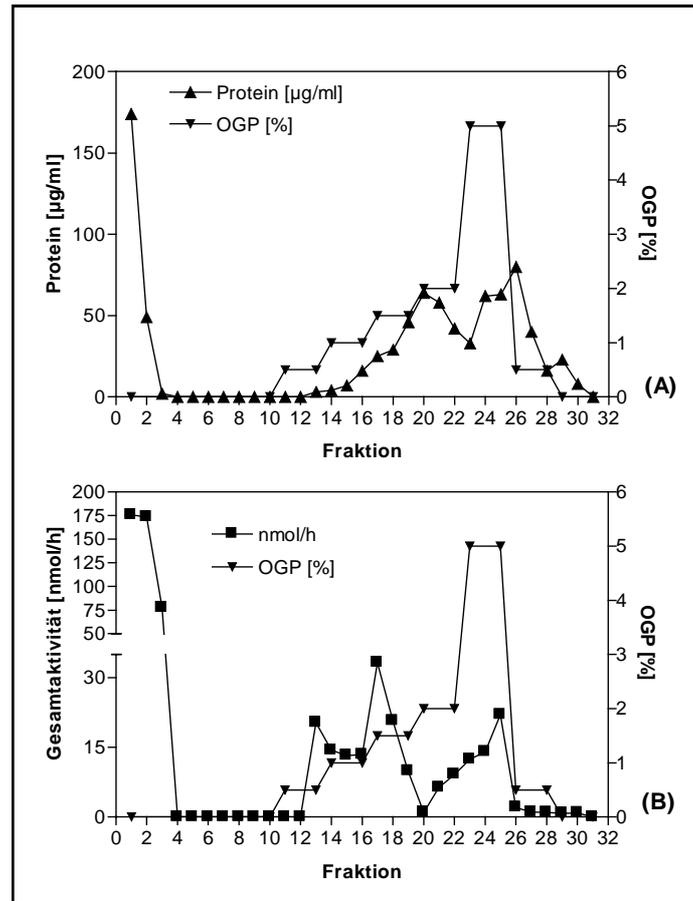


Abb. 3.2.40: OGP-Stufengradient auf der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose

OGP/NaCl-Überstand wurden in LAT-Assay-Puffer auf die Säule gegeben und nacheinander mit 6 x 1 ml LAT-Assay-Puffer, 3 x 1 ml 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 5 % sowie 0,5 % (w/v) OGP + 2 M NaCl und nochmals 0 M NaCl in LAT-Assay-Puffer eluiert. In (A) ist das Protein- und in (B) das Aktivitätsprofil der Elution gezeigt.

Von 1 mg Protein wurden 23 % im Durchlauf (bis Fraktion 10) und 62 % im Eluat gefunden. Die LAT-Aktivität fand sich zu 2 % im Durchlauf und zu 1 % im Eluat wieder. Der Waschschritt bis einschließlich 1,5 % (w/v) OGP zeigte eine Trennung der LAT-Aktivität vom Hauptprotein. Dabei wurde ein Peak zwischen 0,5 und 1 % OGP und ein weiterer Peak zwischen 1 und 1,5 % OGP eluiert. Ein dritter Peak begann ab 2 % und verstärkte ab 5 % OGP zu eluieren.

Aufgrund der hohen Aktivitätsverluste wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

NaCl-Stufengradient auf der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose unter LPC

In den meisten der verwendeten Chromatographie-Methoden stellte sich das Problem, die Enzymaktivität zu erhalten. Eine nachträgliche Rekonstitution stellte sich als sehr schwierig heraus, da die Zahl zu optimierender Parameter sehr groß ist.

Idealer wäre der Aktivitätserhalt während der Chromatographie. Deshalb wurde versucht, das natürliche Substrat Lysophosphatidylcholin, welches selbst detergente Eigenschaften hat, in

Kombination mit dem OGP/NaCl-Überstand auf der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose zu verwenden.

Hierzu wurden 90 μg OGP/NaCl-Überstand mit 380 nmol/h LAT-Aktivität unter 50 μM LPC in LAT-Assay-Puffer auf die 18-Amino-Ölsäure-Sepharose aufgetragen und mit je 1 ml 0,1 M; 0,5 M; 1 M; und 2 x 1 ml 2 M NaCl in LAT-Assay-Puffer eluiert. 100 μl jeder Fraktion wurde zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

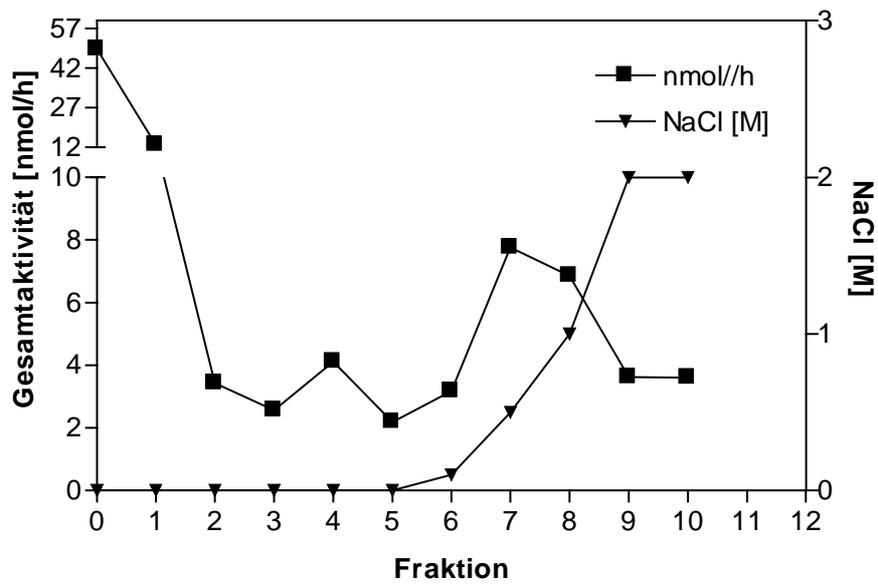


Abb. 3.2.41: 18-Amino-Ölsäure-Sepharose unter LPC

OGP/NaCl-Überstand wurde unter 50 μM LPC in LAT-Assay-Puffer auf die 18-Amino-Ölsäure-Sepharose aufgetragen. Die Elution erfolgte mit je 1 ml 0,1 M; 0,5 M; 1 M; und 2 x 1 ml 2 M NaCl in LAT-Assay-Puffer. Gezeigt ist die Gesamtaktivität in 1 ml Fraktion.

Von den aufgetragenen 380 nmol/h LAT-Aktivität wurden im Durchlauf (bis Fraktion 5) 74 nmol/h (19 %) gefunden, während das Eluat 25 nmol/h (7 %) enthielt. Zwischen 0,5 und 1 M NaCl wurde ein Aktivitätspeak eluiert.

3.2.3.7 Kombination von Säulen

Angestrebtes Ziel jeder chromatographischen Proteinreinigung ist die Optimierung einzelner Verfahren und die anschließende Kombination geeigneter Methoden. Die LAT-Aktivität wurde bei den eingesetzten Säulenverfahren meist zu 80-95 % zerstört. Ansätze zur Rekonstitution von Aktivität waren zu problematisch und konnten hier keine Abhilfe leisten. Es zeigte sich, daß vor allem die Hydroxylapatit-Fractionen für weitere Chromatographieschritte nutzbar sein könnten.

Aus der Gelfiltration (s. Abb. 3.2.12) wurde zu diesem Zweck die Fraktion 3 (95 μg) komplett auf die 18-Amino-Ölsäure-Sepharose (NHS-aktiviert) aufgetragen.

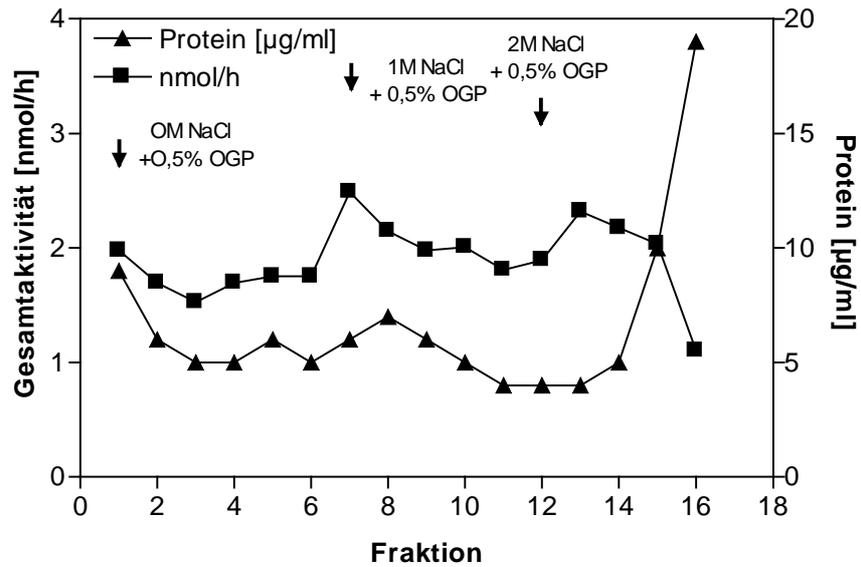


Abb. 3.2.42: Verwendung der 18-Aminö-Ölsäure-Sepharose (NHS-aktiviert) nach Gelfiltration

95 µg Protein aus Fraktion 3 der Gelfiltration (Abb. 3.2.12) wurden auf die Säule aufgetragen. Mit einem NaCl-Gradient + 0,5 % (w/v) OGP wurde eluiert bei einer Fraktionsgröße von 1 ml. Gezeigt sind das Protein- und Aktivitätsprofil.

Das Protein wurde weitgehend gebunden und konnte mit 2 M NaCl eluiert werden. Dabei war die Aktivität minimal und korrelierte kaum mit dem Hauptprotein.

Für eine Kombination mit der Gelfiltration scheint die 18-Amino-Ölsäure daher kaum geeignet.

Die Abbildung zeigt, daß das Protein erst spät unter 2 M NaCl + 0,5 % (w/v) OGP eluierte. Die Aktivität scheint weitgehend zerstört. Es gelang in dieser Kombination nicht, die Aktivität besser zu erhalten.

Die Verwendung der Palmitoyl-CoA-Agarose erwies sich als vielversprechend (s. Abb 3.2.29.). Zur Abtrennung der LAT-Aktivität vom Hauptprotein könnte die Kombination mit der Hydroxylapatitchromatographie ideal sein.

Aus dem Hydroxylapatitlauf (Abb. 3.2.18) wurden dazu die Fraktionen 21,22 und 23 (ca. 100 µg) aus dem Peak II komplett auf die Palmitoyl-CoA-Agarose aufgetragen. Es wurde mit einem 0-3 % OGP-Gradient eluiert und die LAT-Aktivität gemessen.

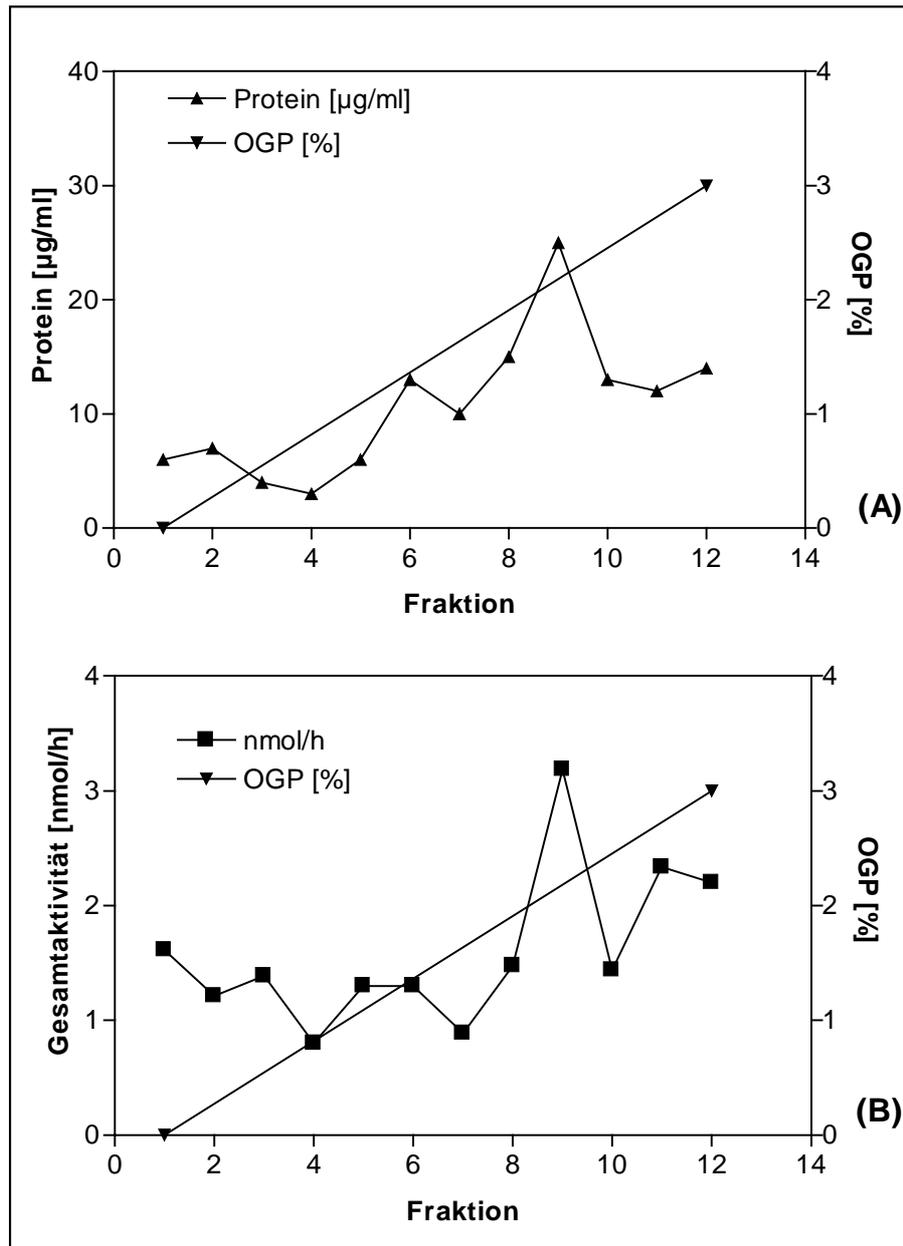


Abb. 3.2.43: Palmitoyl-CoA-Agarose nach Hydroxylapatit

Die Fraktionen 21,22 und 23 (ca. 40 μg) aus Peak II der Hydroxylapatit (Abb. 3.2.18) wurden komplett aufgetragen und mit einem OGP-Gradient eluiert. Gezeigt ist in (A) das Protein- und in (B) das Aktivitätselutionsprofil.

Das Proteinprofil aus (A) zeigt, dass das Protein auf der Säule gebunden hat und zwischen 1 und 2,5 % (w/v) OGP eluiert werden konnte. Ein leichter Peak ist in Fraktion 9 zu erkennen. Dieser Peak ist identisch mit dem der Aktivität aus (B). Die Restaktivität ist aber insgesamt ausgesprochen gering und die Kombination beider Säulenverfahren wurde nicht weiter verfolgt.

Weitere angewandte Kombinationen waren die 18-Amino-Ölsäure-Sepharose nach der Hydroxylapatit-Chromatographie und die Gelfiltration gefolgt von der Palmitinsäure-Sepharose. Alle Verfahren resultierten letztlich in der vollständigen Zerstörung der LAT-Aktivität und waren damit nicht in Kombination einsetzbar.

3.2.4 Native Page zur Auftrennung von Detergens-behandelten Protein-Komplexen

Wie unter dem Kapitel Gelfiltration schon erwähnt, sollte der aktive OGP/NaCl-Komplex mit dem zwitterionischen Detergens CHAPS in möglicherweise kleine aktive Fragmente gespalten werden. Die Native PAGE wurden zur Trennung verwendet.

Zunächst sollte der Einfluß verschiedener CHAPS-Konzentrationen auf die Einwanderung von Protein ermittelt werden.

Hierzu wurden 124 µg ammoniumsulfatpräzipitierter OGP/NaCl-Überstand in 70 µl finalem Volumen mit CHAPS in den Verhältnissen 1:5, 1:10 und 1:20 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf einem 4 % nativen PAGE-Gel getrennt. LAT-Aktivitätsmessungen zeigten eine Abnahme mit steigender CHAPS-Konzentration.

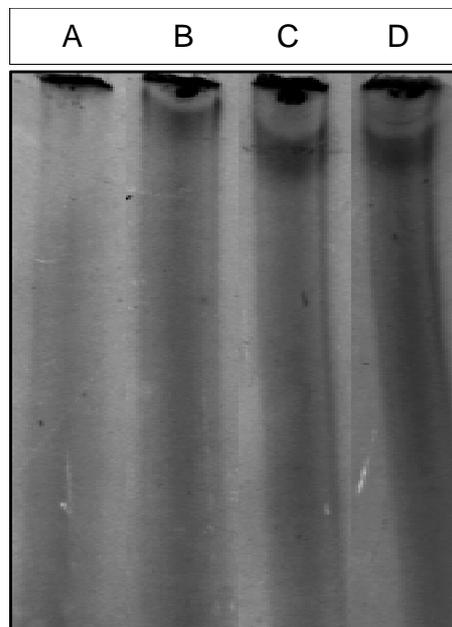


Abb.3.2.44: Native PAGE: CHAPS-Abhängigkeit

Ammoniumsulfat-präzipitierter OGP/NaCl-Überstand wurde mit CHAPS in den Verhältnissen 1:5, 1:10 und 1:20 30 min bei 4°C inkubiert und auf einer 4 % Native PAGE getrennt. Gezeigt sind die Protein:CHAPS-Verhältnisse: A= 1:0, B= 1:5, C= 1:10 und D= 1:20. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Gezeigt ist eins von 3 repräsentativen Experimenten.

Mit dem Anstieg der CHAPS-Konzentration ist eine deutliche Einwanderung von Proteinbanden zu erkennen. Der breite Bandenverlauf deutet auf viele Proteine hin. Um die Frage nach einer eingewanderten aktiven LAT-Proteinbande zu klären, wurde z.T. die Aktivität in Gelfragmenten gemessen. Zum Anderen wurde auch hier der Photoaffinitätsmarker eingesetzt. Im Vorfeld war es dafür wichtig, den Einfluß des Photoaffinitätsmarkers auf die Komplexzerlegung zu untersuchen. Hierzu wurden 124 µg OGP/NaCl-Überstand mit 1:20 Detergens vor der Markierung 30 min bei 4°C inkubiert und danach markiert. In einem Parallelversuch wurde das Protein zuerst markiert und dann mit 1:20 CHAPS für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 4 % Native PAGE -Gel.

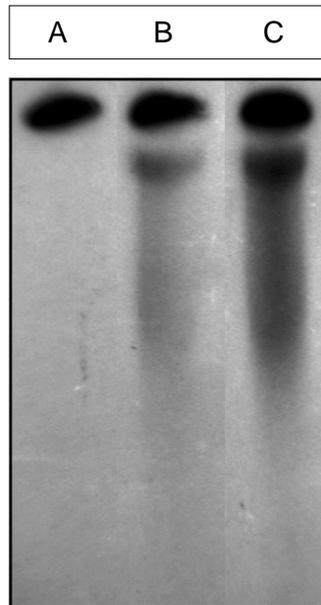


Abb. 3.2.45: Photoaffinitätsmarkierung vor oder nach der CHAPS-Inkubation

OGP/NaCl-Überstand wurden zuerst mit 1: 20 Detergens 30 min bei 4°C inkubiert und dann markiert (C. In einem Parallelversuch (B) wurde das Protein zuerst markiert und dann mit 1:20 CHAPS für 30 min bei 4°C inkubiert. In (A) ist der Überstand ohne CHAPS gezeigt. Die Trennung erfolgte auf einem 4 % Native PAGE-Gel. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie und ist ein repräsentatives aus drei Experimenten.

Die Bindung des 125 Jod-Markers scheint die Zerlegung des Komplexes durch CHAPS negativ zu beeinflussen. Die CHAPS-Inkubation wurde daher in den folgenden Experimenten vor der Markierungsreaktion durchgeführt.

Photoaffinitätsmarkierung von CHAPS-behandeltem OGP/NaCl-Überstand

124 μ g OGP/NaCl-Überstand wurden mit CHAPS im Verhältnis 1:20 30 min bei 4°C inkubiert und dann mit 250 μ M ASO-CoA \pm 100 μ M ACoA als Kompetitor versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach weiteren 3 min bei 37°C und UV-Belichtung für 1 min wurden die Proben auf einer 4 % Native PAGE getrennt.

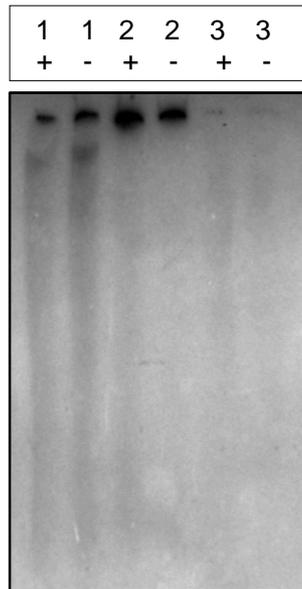


Abb.3.2.46: Native PAGE: OGP/NaCl-Überstand CHAPS

OGP/NaCl-Überstand wurde mit CHAPS im Verhältnis 1:20 für 30 min bei 4°C inkubiert und dann mit 250 μ M ASO-CoA \pm 100 μ M ACoA als Kompetitor versetzt. Die Trennung erfolgte auf einer 4 % Native PAGE. Auf der Autoradiographie ist in 1 der Überstand + 1:20 CHAPS, in 2 der Überstand ohne CHAPS und in 3 nur CHAPS gezeigt.

Die Abb. 3.2.46 zeigt, daß nur unter 1:20 CHAPS eine markierbare Proteinbande abgetrennt wurde. Diese war darüberhinaus leicht durch ACoA verdrängbar. In der Geltasche ist ebenfalls eine Verdrängung des Markers zu erkennen.

Es wurde im nächsten Schritt untersucht, wie viele Proteinbanden sich unter der hier markierten Bande befanden. Dazu wurde die CHAPS-Behandlung und Markierung, wie in Abb.3.2.46 gezeigt, wiederholt und die durch CHAPS abgetrennte Bande ausgeschnitten und nach Äquilibrierung im Sammelgel-Puffer auf einem 12,5 % SDS-Gel getrennt.

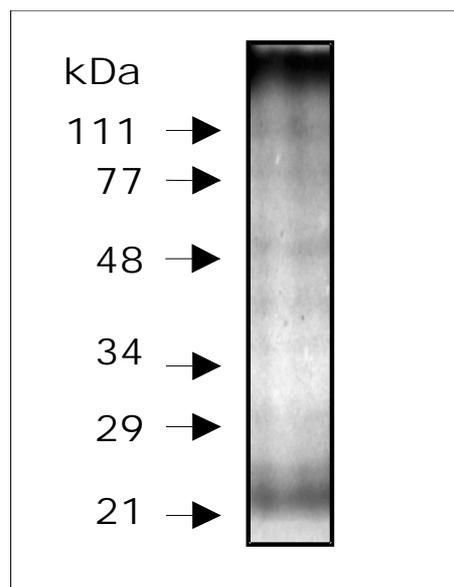


Abb. 3.2.47: Zweite Dimension: SDS-Gel nach Native PAGE

Durch CHAPS-Behandlung abgetrenntes Protein wurde nach der Native PAGE ausgeschnitten und nach Equilibrierung im Sammelgel-Puffer auf einem 12,5 % SDS-Gel getrennt. Gezeigt ist die Autoradiographie.

Die Auftrennung der markierten Native PAGE-Bande machte deutlich, daß eine Reihe von Banden den Photoaffinitätsmarker gebunden hatten. Eine Betrachtung der Einzelbanden schien daher nicht interessant, zumal eine direkte Sequenzierung mit gebundenem ^{125}J -Marker nicht praktikabel war.

3.2.5 Auftrennung von Proteinfractionen über 2D-Elektrophorese

Die geringe Selektivität der eingesetzten chromatographischen Methoden erschwerte die Erkennung minimal angereicherter Proteinbanden auf den jeweiligen Gelen. Speziell silbergefärbte Banden ließen sich bei höherem Proteinauftrag nicht mehr zuverlässig separieren (z. B. für die Mikrosequenzierung). Daher war die Etablierung einer geeigneten Trennmethode von Bedeutung. Das größte Potential hat dabei die zweidimensionale Gelelektrophorese. Zunächst wurden die einzelnen Präparationsfraktionen im Vergleich untersucht. Hierzu wurden jeweils 200 µg Protein nach *Wessel & Flügge (1983)* gefällt und in 50 µl Lysis-Puffer + 20 µl 1 M DTT resuspendiert. In 180 µl Rehydrationspuffer gelöst wurde die Probe auf den IGPphor-Streifen (pH 3-10, linear, 13 cm) appliziert und das Programm der IEF gestartet. Die Puffer der IEF wurden mit und ohne 2 M Thioharnstoff getestet.

Nach Beendigung der ersten Dimension wurde der IGPphor-Streifen im Equilibationspuffer für 15 min inkubiert und dann auf ein 20 x 20 cm 10 % SDS-Gel aufgelegt und die Proteine in der zweiten Dimension getrennt.

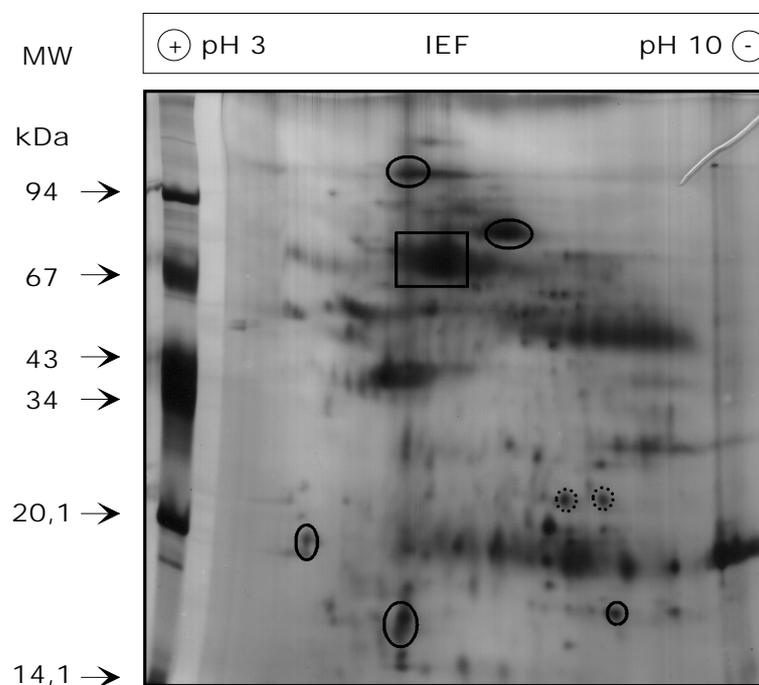


Abb. 3.2.48: 2D-Elektrophorese mit Ausgangsmembranen

200 µg der Ausgangsmembranen wurde zweidimensional getrennt. In allen Puffern war zusätzlich 2 M Thioharnstoff vorhanden. Nach der Trennung wurde das Gel silbergefärbt. Übereinstimmende Spots verschiedener Fraktionen wurden markiert. Quadratisch: Übereinstimmung von Spots aus 3.2.48 mit Spots aus Abb. 3.2.50, 3.2.51 und 3.2.52; rund geschlossen: Abb.3.2.50 und 3.2.51; rund unterbochen: mit Abb. 3.2.51 und 3.2.52.

Das Gel mit den Ausgangsmembranen (Abb. 3.2.48) zeigt eine gute Trennung von Proteinen im Bereich 14 bis 100 kDa und pH 3 bis 10. Besonders auffällig sind dabei Proteinballungen bei einem MW von 20 kDa, 50 und 70 kDa bzw. am isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 7. Es ist zu erwarten, daß viele Proteine ihren pI bei pH 7 besitzen. Die Markierungen stehen für Proteinspots, die auch in weiteren Fraktionierungsschritten wiedergefunden wurden. In nur einem Spot (quadratische Markierung) zwischen 67 und 80 kDa stimmen alle aktiven Proteinfractionen überein. Dieser Spot stellt allerdings auch eine Ansammlung von vielen einzelnen Spots dar. Die Auswertung wurde ohne Verwendung einer Spotanalyse-Software durchgeführt.

Der hochsalzlösliche LAT-Überstand (Abb. 3.2.49) zeigt ein sehr ähnliches Bild im Vergleich mit den Ausgangsmembranen. Aus den zwei großen Proteingruppen der Ausgangsmembranen bei 20 und 60 kDa fand sich ein großer Teil im Hochsalz-löslichem Überstand (pLAT) wieder. Die kleineren markierten Proteine wurden z.T. auch in späteren Fraktionen detektiert und stellen damit möglicherweise Proteine in löslicher und membran-assoziiertes Form dar.

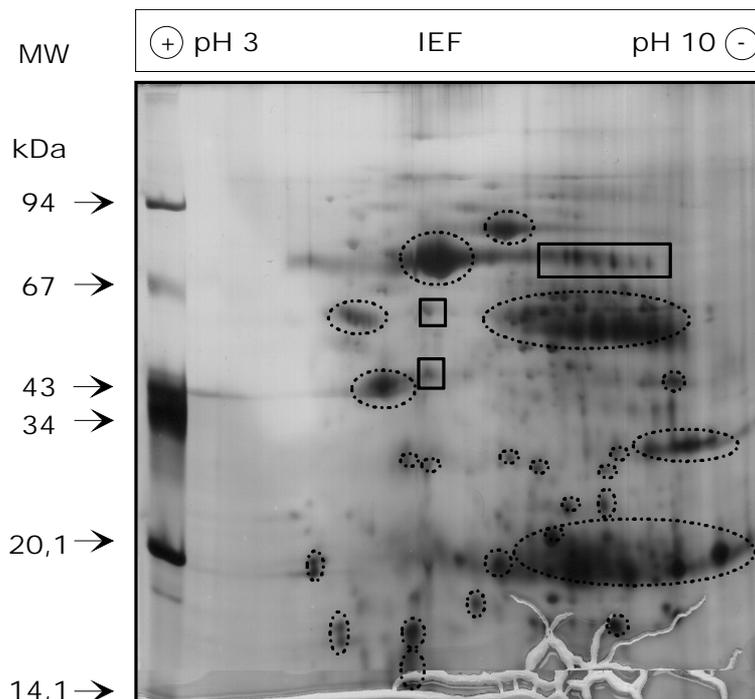


Abb. 3.2.49: 2D-Elektrophorese mit der pLAT

200 µg pLAT wurden zweidimensional getrennt. In allen Puffern war zusätzlich 2 M Thioharnstoff vorhanden. Nach der Trennung wurde das Gel silbergefärbt. Ovale Markierungen zeigen mit Abb. 3.2.48 identische Spots. Rechtecke weisen auf angereichertes Protein hin.

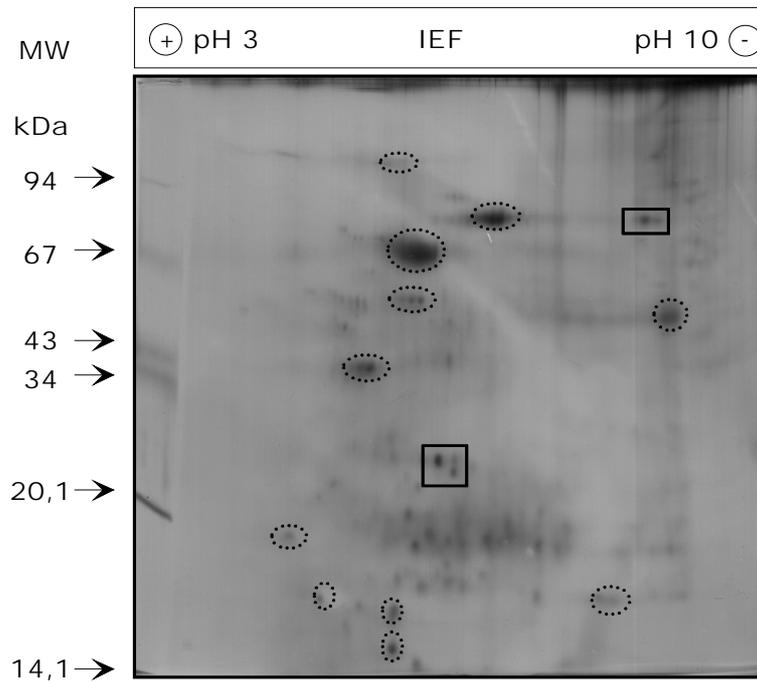


Abb. 3.2.50: 2D-Elektrophorese CHAPS-Überstand

200 μ g CHAPS-Überstand wurden zweidimensional getrennt. Nach der Trennung wurde das Gel silbergefärbt. Ovale Markierungen zeigen mit Abb. 3.2.48 identische Spots; Rechtecke zeigen neue Proteinspots.

Diese Abbildung weist eine starke Verringerung der Bandbreite aufgetrennter Proteine auf. An der Geloberkante zeichnet sich nicht eingewandertes Protein ab.

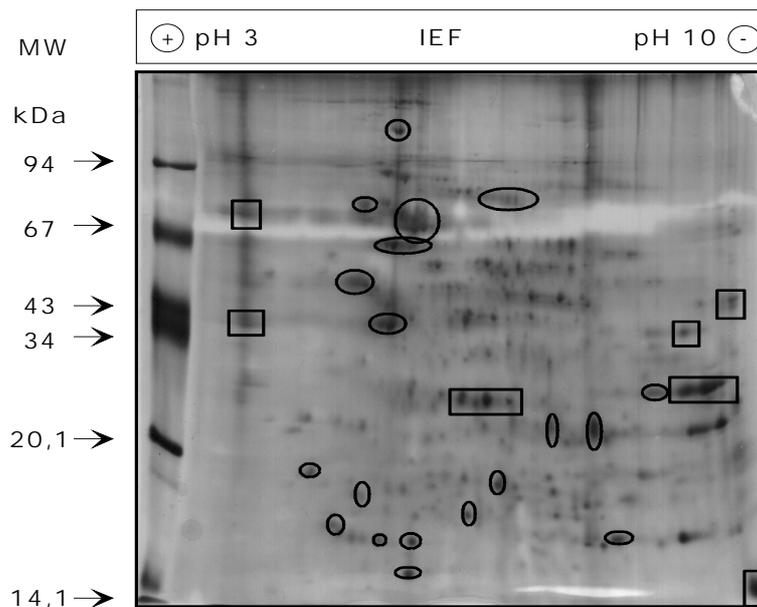


Abb. 3.2.51: 2D-Elektrophorese OGP/NaCl-Überstand

200 μ g OGP/NaCl-Überstand wurden zweidimensional getrennt. Nach der Trennung wurde das Gel silbergefärbt. Ovale Markierungen zeigen Übereinstimmungen mit Spots aus Abb. 3.2.48, während Rechtecke in der Fraktionierung angereicherte Proteine markieren.

Das 2D-Gel vom OGP/NaCl-Überstand weist sehr gut fokussierte Proteinspots auf. Die zwischen Ausgangsmembranen und OGP-NaCl-Überstand übereinstimmenden Spots bzw. Spotgruppen sind in Abb.3.2.48 markiert. Daneben tauchen neue Spots verstärkt auf (eckig markiert). Die große Anzahl erschwert die Identifizierung von LAT-Kandidatenproteinen.

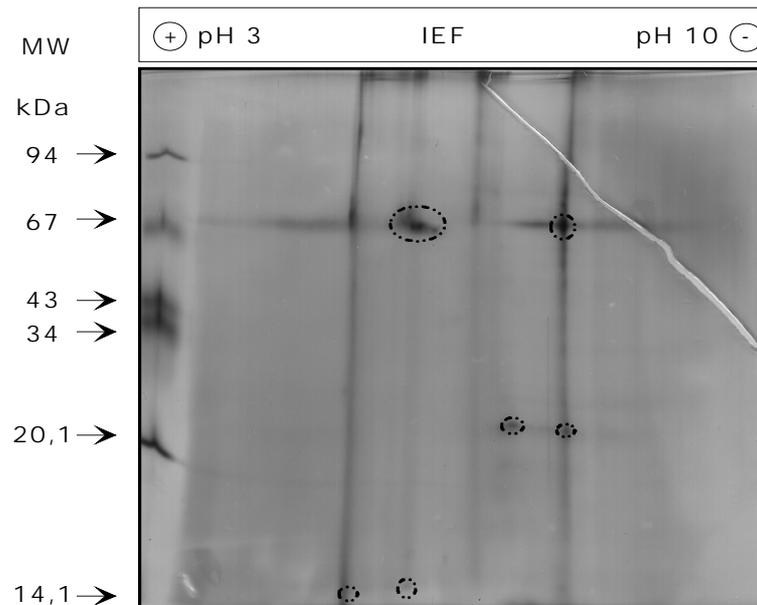


Abb. 3.2.52: 2D-Elektrophorese Palmitoyl-CoA-Konzentrat

Palmitoyl-CoA-Konzentrat wurden zweidimensional getrennt. Nach der Trennung wurde das Gel silbergefärbt. Durch ovale Markierungen sind Spotübereinstimmungen mit der Abb. 3.2.48 gekennzeichnet.

Die Palmitoyl-CoA-Fraktion bestand aus ca. 117 μg nach *Wessel & Flügge (1983)* gefälltem Protein. Im Vergleich zu den vorherigen Fraktionen stellt diese die Reinste dar, zumal das Protein aus dem OGP/NaCl-Überstand durch Bindung und nachfolgende Elution über die Palmitoyl-CoA-Agarose isoliert wurde. Die Anzahl der Spots ist für eine Proteinmenge von 117 μg vergleichend gering. Es stellt sich daher auch die Frage nach der Effizienz der Proteinfällung in der jeweiligen Aufreinigungsstufe. Möglicherweise können diese sehr hydrophoben Proteine nicht mehr gut silbergefärbt werden.

Es fallen hier zwei 67 kDa, zwei 20 kDa und zwei 14k Da große Proteine auf. Ein Teil des Proteins scheint, wie bei nahezu allen 2D-Läufen, an der Geloberkante nicht eingewandert zu sein. Übereinstimmungen mit Spots der Ausgangsmembranen und weiterer Fraktionen sind in Abb. 3.2.48 markiert.

Experimente zur Auftrennung von Hydroxylapatit-vorgereinigten und konzentrierten Fraktionen wurden nach der ersten Dimension abgebrochen, da Proteinpräzipitationen die isoelektrische Fokussierung beeinträchtigte.

3.3 Immunologische Verfahren

Die Yamanouchi Research Institute, Oxford, UK, stellte im Rahmen einer Kooperation einen Antikörper (Kaninchen-anti-CoA-abhängige Acyltransferase Antikörper) zur Verfügung. Es sollte festgestellt werden, ob die LAT-Präparationsfraktionen aus Plazenta das Antigen enthalten. Ziel einer Immunpräzipitation war die Frage nach der Spezifität des eingesetzten Antikörpers. Weiterhin sollte im direkten Vergleich der Einfluß von Präimmuns serum und Immuns serum auf die LAT-Aktivität gezeigt werden.

3.3.1 Western Blot/ECL-Detektion

Die ECL-Reaktion wurde wie unter 2.6.1 beschrieben durchgeführt. Zum Einsatz kamen verschiedene Fraktionen der Aufreinigung. Neben der Ausgangsmembran (CM) wurden wenig aktive Fraktionen wie pLAT und ÜS₁* sowie hochaktive Fraktionen mit CHAPS-ÜS und dem OGP/NaCl-Überstand eingesetzt. Ein enzymatisch aktives Konzentrat der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose (NHS-aktiviert) wurde ebenfalls eingesetzt.

25 µg des entsprechenden Proteins wurden auf einem 7,5 % Laemmli-SDS-Trenngel elektrophoretisch separiert und im Anschluß wie unter 2.5.9.1 beschrieben im Semi-Dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Blockierung über Nacht wurde die ECL-Reaktion wie in 2.6.1 gezeigt durchgeführt.

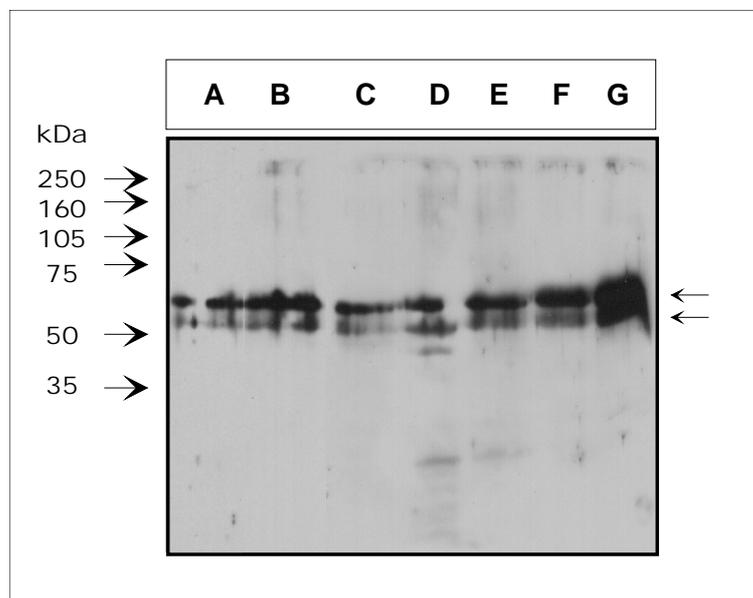


Abb. 3.2.53: ECL-Detektion mit dem Kaninchen-anti-CoA-abhängige AT-Antikörper

Die Präparationsfraktionen A (CM), B (CHAPS-ÜS), C (pLAT), D (P₂), E (OGP/NaCl-ÜS), F (ÜS₁*) und G (18-Amino-Ölsäure-Sepharose (NHS-aktiviert)-Konzentrat) wurden auf einem 7,5% Laemmli-SDS-Gel getrennt und mit dem Semi-Dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. In der ECL-Reaktion wurde ein Kaninchen-anti-CoA-abhängige Acyltransferase-Antikörper eingesetzt. Die Autoradiographie wurde nach 5 min entwickelt.

Die Abbildung zeigt, daß im wesentlichen nur zwei Banden (55 und 60 kDa, mit Pfeilen markiert) über alle Fraktionen vorkamen. Nur die P₂-Membranen zeigten außerdem eine 45 und eine unter 30 kDa liegende Bande.

Die ersten beiden Banden konnten diskreten Banden auf dem SDS-Gel zugewiesen werden und wurden per Mikrosequenzierung analysiert (s. 3.4.2).

3.3.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde wie in 2.6.2 beschrieben durchgeführt. 2 µg OGP/NaCl-Überstand wurde je Assay mit eine Verdünnungsreihe (Konzentration final: 0,024 -0,000375 mg/ml) des Immuserums, des Präimmuserums und einer Pufferkontrolle für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 20 µl Anti-Kaninchen IgG (bzw. alternativ Protein A) zu jeder Probe, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 4°C. Im Anschluß wurde 2 min für 14000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In Überstand und Pellet wurde die LAT-Aktivität gemessen.

Die Aktivitätsmessungen zeigten erhebliche Schwankungen und waren daher schlecht auswertbar. Insgesamt war die wiedergefundene Aktivität in den Pellets deutlich höher als in den Überständen.

Zwischen dem Immuserum und dem Präimmuserum konnte keinerlei Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Einfluß des anti-CoA-abhängigen AT-Antikörpers auf die LAT-Aktivität

In einem Experiment wurde der direkte Einfluß des Antikörpers auf die LAT-Aktivität gemessen. Es wurde in einer Konzentrationsreihe auch mit der höchsten Konzentration von 0,024 mg/ml keinerlei Inhibition der Aktivität mit dem Immun- oder Präimmuserum gemessen.

3.4 Mikrosequenzierung

Die Mikrosequenzierung verschiedener Proteinbanden wurde in der Regel durch die Proteinmenge limitiert. In vielen Experimenten ging wertvolles Probenmaterial während des Blotting-Prozesses verloren, in anderen Versuchen erreichten transferierte Proteine auf der PVDF-Membran nicht die zur Sequenzierung erforderliche Bandenschärfe. In letzter Konsequenz wurden daher viele Protein direkt im Gel verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Bei Identität mit Peptiden aus einem theoretischen Verdau war eine weitere Sequenzierung nicht mehr erforderlich.

3.4.1 Identifizierung der 160 kDa-Proteinbande

Nachdem vergeblich versucht wurde, die 160 kDa-Proteinbande (s. Abb. 3.2.39) im Semi-Dry-Verfahren auf die PVDF-Membran zu transferieren, wurde das Naßblotting zu diesem Zweck getestet. Aber auch diese, speziell für große Moleküle gedachte Transfermethode, war nicht erfolgreich, so daß letztlich die ausgeschnittene Proteinbande komplett verdaut und im MALDI-TOF untersucht wurde. Es wurden 19 Peptide mit 252 von 1474 Aminosäuren (17 %) identifiziert. Diese stimmten mit gleichen Fragmenten aus einem theoretischen Trypsin-Verdau des α -2-Makroglobulin Vorläufers (Datenbankeintrag: swissprot-AccNumber: P011023) überein.

Die Analyse ergab für die 160 kDa Bande das α -2-Makroglobulin-Vorläuferprotein, daß in humaner Plazenta zu finden ist.

3.4.2 Identifizierung der 57, 60 und 66 kDa Proteinbanden

Mittels Western-Blot und ECL-Reaktion (s. Abb. 3.2.53) konnten zwei Proteinbanden nachgewiesen werden. Diese wurden direkt im Gel verdaut und die Fragmente mit dem MALDI-TOF analysiert.

Die 60 kDa Proteinbande

Die MALDI-TOF-Analyse der „oberen“ ECL-Bande ergab 13 identifizierte Peptide (163 von 527 Aminosäuren, 30,9 %). Diese stimmten mit dem theoretischen Trypsin-Verdau der humanen Monoamin Oxidase (MAO-A, Datenbankeintrag: swissnew-AccNumber: P21397) überein.

Die 60 kDa große humane Monoamin Oxidase wurde ebenfalls in humaner Plazenta gefunden.

Die 57 und 66 kDa Proteinbanden

In der zweiten („untere“) Proteinbande der ECL-Reaktion wurden zwei übereinanderliegende Proteine ermittelt. Das kleinere Protein ist mit 57 kDa der Mannose-spezifische Lectin Vorläufer (auch ERGIC 53 genannt, Datenbankeintrag: sptreml-AccNumber: Q12895). Neun Peptide (106 von 510 Aminosäuren) stimmten im theoretischen Verdau des ERGIC 53 überein. ERGIC 53 ist ein Membranprotein aus dem intermediären endoplasmatischen Retikulum-Golgi. Es ist identisch mit MR60, einem Mannose-spezifischen Lektin aus myelomonocytyären Zellen.

Für das zweite Protein ergab ein Vergleich mit dem tryptischen Verdau von p63 (Datenbankeintrag: sptreml-AccNumber: Q07065) eine Übereinstimmung in 15 Peptiden (169 von 601 Aminosäuren). Hierbei handelt es sich um ein reversibel palmitoyliertes Protein aus dem intermediären endoplasmatischen Retikulum-Golgi mit Verwandtschaft zu Hitzeschockproteinen.

4. Diskussion

Relevanz der LAT im Rahmen der Zellproliferation

Die Synthese von Arachidonsäure aus seinen Vorläufern mittels des Fettsäure-Desaturase-Stoffwechselwegs und die Freisetzung durch den Lands-Zyklus sind die wichtigsten Regulationseinheiten zur Kontrolle des Arachidonsäuregehalts von Phospholipiden (*McDonald und Sprecher 1991*). Die Mobilisation der Arachidonsäure aus Phospholipiden stellt dabei einen wichtigen regulatorischen Schritt in der zellulären Antwort auf bestimmte Stimuli wie z. B. Cytokine oder Wachstumsfaktoren dar (*Piomelli et al., 1993; Handler et al., 1994*). Freigesetzte Arachidonsäure kann entweder durch Cyclooxygenasen zu Prostaglandinen oder aber durch Lipoxygenasen zu Lipoxinen und Leukotrienen umgesetzt werden.

Es wurde postuliert, daß Arachidonsäure und seine Metabolite zur Tumorentstehung und zum fortschreitenden Wachstum bestimmter Tumorzelllinien (durch Steigerung der Zellproliferation) beitragen (*Ondrey et al., 1996; Butcher et al., 1993; Sauer et al., 1993*).

Aus der Literatur sind einige Hinweise auf die direkte Involvierung der LAT im Stoffwechsel von Tumorzellen bekannt. Eine signifikante Aktivierung der Lysophosphatidylcholin: Acyl-CoA-O-Acyltransferase verbunden mit einer Senkung des Arachidonsäurespiegels konnte auch in Rattenleberzellen (Morris hepatoma 7777) nachgewiesen werden (*Reitz et al., 1977*).

Abnormale Fettsäurezusammensetzungen wurden auch in Prostata-Tumorzelllinien und dem humanem Prostataadenokarzinom gemessen. Die Arachidonsäurekonzentration in Prostatakrebsgewebe ist deutlich erniedrigt (*Narayan et al., 1991; Chaudry et al., 1991; Dahiya et al., 1992*). Ein Vergleich der am Phospholipid-Remodelierungsprozeß beteiligten Enzyme in humanem und Ratten-Prostatagewebe (Pollard's Lobund/Wistar rat prostate cancer model) führte zu dem Ergebnis, daß die Phospholipase A₂ um den Faktor 2 und die Lysophosphatidylcholine:Acyl-CoA-O-Acyltransferase um den Faktor 4-12 erhöht sind. Die Aktivitäten der Fettsäure:Acyl-CoA-Synthetase und Fettsäure:Acyl-CoA-Hydrolase waren in malignem nicht höher als in gutartigem Prostata-Gewebe und zeigen daher, daß die Aktivitätserhöhung der LAT und PLA₂ nicht Ausdruck einer allgemein höheren Zellproliferation oder der Proliferation des Endoplasmatischen Retikulums sind (*Faas et al., 1996*).

Die kombinierte Steigerung der Acyltransferase und der Phospholipase des Reacylierungs-Deacylierungs-Zyklus deutet auf ein verstärktes Phospholipid-Remodelierung in bösartigen Prostatageweben hin.

Die Senkung des Arachidonsäurespiegels in Prostatagewebe ist jedoch keine generelle Beobachtung bei malignen Tumoren. So wurde in kolorektalen Tumoren bei Ratten ein erhöhter Arachidonsäurespiegel festgestellt (*Nicholson et al., 1991*). Der verminderte Einbau

von PUFA, wie Arachidonsäure, in Phospholipide (gemessen im Serum) wurde auch bei Brustkrebspatienten gemessen (*Hradec et al., 1998*).

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, welchen Aktivierungszustand die LAT in T-Zell-Tumorzelllinien hat. Hierzu wurden der Einbau von Linolsäure und die direkte LAT-Aktivität (Zellhomogenate im LAT-Assay) von T-Lymphozyten (Normalspender) mit Tumor-T-Zelllinien verglichen (s. Abb.3.1.1). T-Lymphozyten von Normal Spendern wurden in einem speziellen Rosettierungsverfahren mittels Schafserythrozyten reinst isoliert und im FACS mittels CD14 und CD3 mit über 95 % Reinheit als T-Zellpopulation (E⁺-Zellen) charakterisiert. Sie zeigten als Kontrolle den geringsten Einbau von Linolsäure; nach einer Stimulation mit PHA zeigte sich nur eine geringe, aber mit einer 1,5-fachen Steigerung in 4 Stunden physiologisch signifikante Erhöhung des Einbaus. Die Tumorzelllinie CEM zeigte im Vergleich zu Kontroll-T-Zellen einen 10-fach höheren Linolsäureeinbau. Die zwei verwendeten Patientenzelllinien stellen primäre T-Zell-Kulturen aus Patientenmaterial mit dem Krankheitsbild der akuten lymphatischen Leukämie dar (T-ALL-Blasten). Ihre Einbauraten lagen ebenfalls bedeutend höher als die der Kontrollansätze. Die direkte LAT-Aktivitätsmessung in Zellhomogenaten durch den Einbau von Arachidonoyl-CoA in [¹⁴C]-Lysophosphatidylcholin zeigte eine ähnliche Tendenz. Die CEM-Linie hatte mit 35 nmol/mg/min die höchste spezifische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle mit 15 nmol/mg/min.

Diese Ergebnisse stimmen mit der in Prostata-Gewebe beschriebenen LAT-Aktivierung überein und lassen eine Relevanz des Phospholipid-Remodelierungsprozeß auch in T-Zell-Tumorlinien für möglich erscheinen. Um die selektive Aktivierung der Reacylierungs-Deacylierungsenzyme zu zeigen, müßten auch hier Phospholipase-, Hydrolase- und Acyl-CoA-Synthetase-Aktivitäten gemessen werden.

Speziell für humane T-Zellen konnten in unserer Arbeitsgruppe die Hemmung der Aktivierung von T-Zellen durch Cyclosporin und des weiteren eine Hemmbarkeit der während der T-Zellaktivierung stattfindenden LAT-Neuexpression durch Glucocorticoide (*Kerkhoff et al., 1997*) gemessen werden. Von *Ito et al. (1998)* wurde eine, vermutlich durch Induktion von Apoptose vermittelte, Inhibition des Wachstums der T-ALL-Zellen gezeigt. Im gleichen Zusammenhang konnte in HL-60-Zellen eine Blockierung der Arachidonsäure-Phospholipid-Remodelierung über eine induzierte Apoptose festgestellt werden (*Surette et al., 1996*). Weitere Indizien für die Bedeutung der Apoptose wurden in diesem Zusammenhang auch von *Lo et al. (1998)* gezeigt. In Keratinozytontumorlinien (Hel-30) konnte durch die Einführung von antisense cDNA für die cytosolische Phospholipase A₂ ein Anstieg der Apoptose induziert werden.

Die Umverteilung von Fettsäuren, speziell Arachidonsäure, in Phospholipiden könnte durchaus ein Signal zur Kontrolle der Zellproliferation darstellen. Ein solcher Mechanismus wäre auch für die T-ALL-Blasten möglich. Klinische Relevanz könnte der Entwicklung

spezifischer LAT-Inhibitoren zukommen. Als Anti-Tumor-Wirkstoff wäre eine Kombination mit bekannten Zytostatika denkbar.

Strategien zur Aufreinigung der integralen LAT aus humaner Plazenta

Die LAT wurde in unserer Arbeitsgruppe aus verschiedenen Quellen isoliert. Präparationen aus humaner Plazenta zeichneten sich gegenüber solchen aus Schweinemilz durch eine höhere Aktivität aus. In einer vorangegangenen Arbeit (*Gehring, 1997*) wurde die Reinigung auf eine nach *Kerkhoff et al. (1996)* benannte periphere LAT-Aktivität konzentriert. Fazit dieser Bemühungen war die Erkenntnis, daß es sich bei der pLAT vermutlich um eine vesikuläre Transportform neusynthetisierter LAT handelt. Die pLAT wies assoziiertes Protein und Lipid auf und lieferte somit ein chromatographisch uneinheitliches Bild. In Experimenten mit dem nach *Gehring et al. (1998)* synthetisierten Photoaffinitätsmarker wurde in SDS-PAGE-Gelen darüberhinaus offenbar aggregiertes Protein in den Geltaschen oder an der Grenze zum Trenngel markiert.

Die Hinweise auf das Vorliegen größerer Proteinaggregate bzw. Komplexe der LAT waren der Ausgangspunkt dieser Arbeit. Der Schwerpunkt der Aufreinigung wurde von der pLAT-Aktivität auf die membranintegrierte Aktivität verlagert, da diese den quantitativ größeren Anteil darstellt und außerdem eine höhere enzymatische Aktivität besitzt. Damit wurde eine vollständig neue Aufreinigungstrategie erforderlich, welche gleichzeitig auch die Entwicklung neuer Affinitätsmatrizen umfaßte.

Aus der Literatur waren erste Ansätze zur Aufreinigung von Lysophospholipid-Acyltransferasen, speziell der LAT, aus den unterschiedlichsten Organismen, Geweben und Zellen bekannt. Die Strategien zur Proteinaufreinigung unterschieden sich dabei hauptsächlich in Hinblick auf die erwartete Lokalisation der Enzymaktivität.

Neben einer wenig aktiven, löslichen LAT-Aktivität aus Kaninchenherz (*Needleman et al., 1985*) wurde eine noch geringer aktive LAT aus Rattenmagenmikrosomen (*Grataroli et al., 1991*) beschrieben. Der überwiegende Teil der Untersuchungen wurde mit Membranfraktionen von Zellorganellen wie Zellkernmembranen (*Baker et al., 1981*), Mitochondrienmembranen (*Choy et al., 1992; Arthur et al., 1987*), cis-Golgi-Apparat (*Lawrence et al., 1994*), Plasmamembranen (*Waku et al., 1992; Momchilova et al., 1991*) oder membrangebundener LAT-Aktivität aus mikrosomalen Fraktionen durchgeführt (*Livermore et al., 1988; Estrada, et al., 1985; Wise et al., 1980; Holub et al., 1979*). Die Arbeit von *Renooij et al. (1981)* weist dabei als einzige auf eine transversale Orientierung der LAT in der Membran hin.

Die Lokalisation der LAT erklärt die Notwendigkeit von Detergentien zur Solubilisierung des Enzyms. In diesem Zusammenhang wurde seit der ersten Erwähnung der LAT durch *Lands (1960)* das komplette Spektrum käuflicher und selbstsynthetisierter Detergentien auf die Solubilisierungseffizienz getestet. Mit Na-Cholat konnten *Mukherjee et al. (1992)* die LAT

partiell aus Rattenleber isolieren, während Enzympräparationen aus Rinderherz mit CHAPS (*Sanjanwala et al., 1988*) und Rinderhirn mit Deoxy-Cholat (*Deka et al., 1986*) eine sehr instabile LAT-Aktivität zeigten. Solubilisierungsversuche mit Triton X-100 wurden von *Yamashita et al.* (1975 und 1981) durchgeführt.

Mit diesen Detergentien war die Aufreinigung des LAT-Proteins nur partiell möglich und außerdem war die Enzymaktivität extrem instabil. Die Stabilisierung der Aktivität konnte unter Verwendung natürlicher Detergentien mit Phospholipidstruktur verbessert werden (*Tanford und Reynolds, 1976; Weltzien et al., 1979; Hasegawa-Sasaki und Ohno, 1980*). *Fyrst et al.* (1996) optimierten eine Methode nach *Deamer und Boatman (1980)* und *Gavino und Deamer (1982)*, wobei Rattenleber-Mikrosomen mit Deoxychololat (DOC) lediglich gewaschen und im Anschluß daran mit den LAT-Substraten LPC und Acyl-CoA inkubiert wurden. Die LAT führte zum Aufbau von PC-Vesikeln, welche aktive LAT beinhalten und über einen Glyceringradienten trennbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigung der integralen LAT wurden Plazenta-Mikrosomen zuerst mit 1M NaCl gewaschen unter Erhalt der peripheren LAT (*Kerkhoff et al., 1996*). Das resuspendierte Pellet zeigte eine hohe Aktivität und war Ausgangsmaterial der Solubilisierung durch 0,75 % (w/v) CHAPS. Die Aktivität dieses CHAPS-Überstands (nach einer Zentrifugation bei 100.000 xg) war selbst bei -20°C nicht über längere Zeit stabil, was mit den Literaturangaben übereinstimmt. Im Vergleich hierzu war ein aktiver CHAPS-Überstand aus Schweinemilz überhaupt nicht erhältlich. Dies zeigt möglicherweise die generelle Instabilität der LAT gegenüber CHAPS.

Chattopadhyay et al. (1984 und 1996) konnten die Abhängigkeit der kritischen Mizellarkonzentration (CMC) verschiedener Detergentien von der Ionenstärke nachweisen. Die steigende Ionenstärke führte zu einer meßbaren Erniedrigung der CMC bei geladenen und zwitterionischen Detergentien (*Reynolds et al., 1970*). In dieser Arbeit konnten vergleichbare Messungen diese Ergebnisse für das nicht-ionische Detergens n-Octylglucopyranosid bestätigen. Für das OGP ergab sich eine errechnete CMC von 24 mM ohne Salz, was mit Literaturdaten von *DeGrip et al. (1979)* übereinstimmt. Unter Verwendung von 0,5 M und 1M NaCl zeigte sich eine Erniedrigung auf 21,1 mM bzw. 14,0 M.

Dieser Effekt konnte in der Aufreinigung genutzt werden, indem im ersten Schritt eine Protein-Extraktion mit Detergens und im zweiten Schritt eine Extraktion mit Detergens in Kombination mit hohen Ionenstärken durchgeführt wurden. Das Prinzip der sequenziellen Extraktion führte bei der Solubilisierung der Acyl-CoA:Cholesterin Acyltransferase (ACAT) zu einer fast 100 %igen Extraktion (*Doolittle et al., 1982*) und wurde hier in ähnlicher Weise für die Fraktionierung der LAT genutzt.

P₂-Membranen wurden im ersten Schritt nur mit 2 M NaCl gewaschen. Ein Teil des Proteins mit geringer Aktivität wurde dabei abgetrennt. Im zweiten Schritt konnte in der Kombination 0,75 % (w/v) OGP und 2 M NaCl weiteres Protein mit einem Großteil der LAT-Aktivität solubilisiert werden (OGP/NaCl-Überstand, auch ÜS*2). Nach einer Dialyse gegen LAT-

Assay-Puffer mit 20 % (w/v) Glycerin erwies sich dieser Überstand als sehr stabil und wurde für die meisten chromatographischen Schritte dieser Arbeit verwendet. Die Abb. 3.2.2 zeigt die LAT-Aktivitäten der Fraktionen (P₂-Membranen bis OGP/NaCl-ÜS) im Vergleich. CHAPS zeigt sich am effizientesten bei der Extraktion. Die Abb. 3.2.3 macht deutlich, daß die Vorfraktionierung z. T. zur Anreicherung bzw. Abreicherung von Proteinen führt. Die Verwendung weiterer chromatographischer Techniken bleibt aber auf jeden Fall für eine Reinigung der LAT notwendig.

Die Problematik der Verwendung von Detergentien liegt hauptsächlich in der Inaktivierung der LAT-Aktivität. Detergentien verändern möglicherweise durch die Entfernung von Lipiden aus der Proteinumgebung auch die Substratspezifität des Enzyms, woraus die Hypothese entstand, die LAT könne in multiplen Formen mit variabler Substratspezifität existieren (*Okuyama et al., 1975*). *Mukherjee et al.(1992)* zeigte dagegen weder einen Effekt von Detergentien auf die Substratspezifität noch die selektive Herauslösung einer LAT mit bestimmter Substratspezifität.

Der Einsatz von Detergentien ist häufig limitiert, da diese in der Regel vor chromatographischen Trennungen entfernt werden müssen. Hier spielt die CMC eine bedeutende Rolle. Je höher der CMC-Wert des Detergens, desto leichter dessen Entfernung. Das zwitterionische CHAPS und das nicht-ionische OGP wiesen bei der Extraktion der LAT aus Plazenta einige Vorteile auf. Beide Detergentien gelten als milde Detergentien, die für die Solubilisierung von Membranproteinen geeignet sind. Theoretisch lassen sie sich (z. B. mittels Dialyse) beide leicht abtrennen. Außerdem sind CHAPS und OGP mit den hier verwendeten Techniken kompatibel. OGP zeigt z. B. keine UV/VIS-Absorption.

Komplexzerlegung und Analyse

Zur Zerlegung möglicher Protein-Lipid-Komplexe der LAT aus humaner Plazenta wurde der OGP/NaCl-Überstand weiter mit CHAPS und OGP in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluß von CHAPS auf die pLAT untersucht. Aus der Abb. 3.2.4 wird deutlich, daß mit 0,5 % (w/v) CHAPS nochmals aktives Protein extrahiert werden konnte. Die Auftrennung der pLAT per Gelfiltration (Abb.3.2.9) zeigt, daß auch unter Anwesenheit von OGP im Puffer (zur Verhinderung der Reaggregation) keinerlei Aktivitätspeak unterhalb von 440 kDa separiert werden konnte. Höhere Detergentskonzentrationen bis 2 % ändern daran nichts. Zur weiteren Zerlegung scheinen deutlich höhere CHAPS-Konzentrationen oder ein anderes Detergens notwendig. Die Konzentration von NaCl liegt hier bei 150 mM (LAT-Assay-Puffer) und sollte eine Aggregation hydrophober Proteine vermeiden.

Ähnliche Versuche wurden mit dem OGP/NaCl-Überstand durchgeführt. Die Abb. 3.2.5 und 3.2.6 zeigen in Vorversuchen die Abhängigkeit dieser LAT-Aktivität gegenüber CHAPS und

OGP. Die LAT-Aktivität ließ sich mit 41 mM CHAPS halbieren (Verhältnis Protein:Detergens = 1:10). Selbst bei geringerer Proteinkonzentration im Ansatz wurde die Aktivität mit OGP erst bei 60 mM halbiert, d.h. gegenüber CHAPS ergab sich eine höhere Empfindlichkeit. Beide Detergentien erschienen aber für eine Komplextrennung tauglich. Der OGP/NaCl-Überstand wurde mit CHAPS in einem Verhältnis von Protein:Detergens, 1:15 versetzt und über die Gelfiltration getrennt. Aus Abb. 3.2.10 (B) geht hervor, daß im Vergleich zum Ausgangsmaterial (vgl. Abb.3.2.10 (A)) eine schleichende Einwanderung von LAT zu erkennen war. Da aus dem Vorlauf (A) nur die großen Moleküle der ersten beiden Fraktionen gepoolt und konzentriert auf die Säule (B) gelangten, wird die Abtrennung kleiner Moleküle deutlich. Das Molekulargewicht der Hauptaktivität lag weiterhin oberhalb von 230 kDa. Die Verwendung höherer Detergengkonzentrationen und die zusätzliche Anwesenheit im Elutionspuffer konnten keine weiteren Veränderungen bewirken. Dieses deutet darauf hin, daß es sich bei der nachgewiesenen LAT-Aktivität um einen sehr stabilen Komplex oder ein sehr großes Protein handeln muß.

Obwohl die Gelfiltration des OGP/NaCl-Überstandes nach 1:15 CHAPS-Behandlung keinen diskreten Aktivitätspeak ergab, wurden die Fraktionen 2 bis 5 auf dem SDS-Gel und mittels Photoaffinitätsmarker untersucht. In Abb.3.2.11 zeigt die Autoradiographie, daß eine 77 kDa-Bande in den Fraktionen 3 und 4 deutlich markiert wurde und der Photolabel mit ACoA verdrängbar war. In den Geltaschen war kein Protein markiert. Eine 40 kDa-Bande in den Fraktionen 4 und 5 wurde ebenfalls markiert und verdrängt. Bei der 70 und 40 kDa-Proteinbande handelt es sich sehr wahrscheinlich um Annexin V (40 kDa) und humanes Serumalbumin (HSA, 75 kDa), die im Rahmen der pLAT-Aufreinigung bereits detektiert und sequenziert wurden (*Gehring, 1997*). Im höhermolekularen Bereich der Gelfiltration in Fraktion 2 zeigte sich auch markier- und verdrängbares Protein in der Geltasche. Dies kann auf Proteinaggregate oder in Korrelation mit den Gelfiltrationsdaten für den LAT-Komplex auf sehr große Komplexbestandteile hinweisen. Da die Sensitivität der LAT im OGP/NaCl-Komplex gegenüber CHAPS offenbar sehr groß ist, war eine Inaktivierung durch CHAPS in diesem Zusammenhang nicht unwahrscheinlich. Möglicherweise konnte LAT-Protein auf der Gelfiltration abgetrennt werden, ohne daß Aktivität registrierbar war. Ein weiteres Problem für die Nachweisbarkeit der Aktivität könnte die Notwendigkeit von Acyl-CoA-Bindungsproteinen (ACBP) oder anderen Kofaktoren sein, die durch ihr kleines MW (z. B. 10 kDa in Erythrozyten) auf der Gelfiltration früh abgetrennt würden. *Fyrst et al. (1995)* konnten zeigen, daß ACBP-gebundenes Acyl-CoA von der LAT gegenüber freiem Acyl-CoA als Substrat bevorzugt wird. Ein sehr aufwendiger Anlauf zur möglichen Restaurierung von Enzymaktivitäten kann u.U. durch die Rekombination von nicht-aktiven Proteinpeaks verschiedener Trennstufen erfolgen (*Santini et al., 1992*). In Anbetracht der vielen in Frage kommenden Fraktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit hierauf verzichtet.

Eine LAT-Komplextrennung wurde auch mit OGP im Protein:Detergens-Verhältnis 1:20 versucht. Das Ergebnis war identisch mit dem der CHAPS-Behandlung und wies erneut auf den hohen aggregativen und hydrophoben Charakter der Zielproteine hin. Mittels 0,5 % (w/v) OGP im Puffer kam es zu einer leichten Verschiebung eines Aktivitätspeaks (vgl. Abb. 3.2.12). Neben hochmolekularer Aktivität in den Fraktionen 1 und 2 lag der Aktivitätspeak bei ca. 250 kDa und weitere Aktivität verteilte sich bis zu einem MW von 65 kDa. Die SDS-PAGE in Abb. 3.2.13 zeigt die ersten neun Fraktionen der Gelfiltration aus Abb. 3.2.12. Diverse Banden in Bahn 2 und 3 korrelierten mit der LAT-Aktivität und waren potentielle Kandidaten für eine Sequenzierung.

Die Existenz von Komplexen ist in der Familie der Acyltransferasen bei nativen Enzymen bekannt. Speziell durch die Gelfiltration konnten hochmolekulare Komplexe von mehr als 240 kDa dargestellt werden (*Shimeno et al., 1998*). Häufig existieren Acyltransferasen in einem Lipid-Protein-Komplex mit anderen Enzymen wie Transacylasen (*Hollenback et al., 1998*) mit einem MW von 350 kDa und überstehen eine Detergensbehandlung, wie z. B. die Dihydroxyacetonphosphat Acyltransferase im 210 kDa großen heterotrimeren Komplex mit der Alkyl-dihydroxyacetonphosphat Synthase (*Biermann et al., 1999*). Mit Hinblick auf die Multienzymkomplexe der β -Oxidation läßt sich die Vielfalt möglicher Oligomere und enzymatischer Konfigurationen nur grob erahnen.

Speziell für die LAT wurden Komplexe mit anderen Enzymen beschrieben. *Szamel et al. (1987)* beschrieben die LAT im Komplex mit 30 bis 170 kDa großen Proteinen während der T-Zellaktivierung. Komplexpartner waren dabei die Ca^{2+} -ATPase und $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. *Goppelt et al. (1986)* nannten diese Komplexe (mit hohem PC und geringen PE und PS Gehalt) Membrancluster.

Während sich diese Enzymkomplexe unter nativen Bedingungen schwer in Einzelkomponenten trennen lassen, kann eine denaturierende Behandlung zur Zerlegung in die Polypeptid- oder Enzymuntereinheiten führen (*Kasinathan et al., 1990*). Die Trennung in Untereinheiten oder singuläre Enzyme ist meist begleitet von der teilweisen bis vollständigen Inaktivierung.

Native PAGE zur Trennung des LAT/Protein/Lipidkomplexes

In weiteren Experimenten wurde CHAPS zur sukzessiven Zerstörung der LAT-Aktivität eingesetzt. Absicht dieser Fragmentierung war die Annahme, daß ein LAT-Komplex aus Proteinen und Lipiden auf diese Weise zerlegt und elektrophoretisch unter nativen Bedingungen aufgetrennt werden könnte. Tatsächlich führte die Abnahme der LAT-Aktivität in den Protein:Detergens-Verhältnissen von 1:1 bis 1:20 auf einem nativen PAGE-Gel zur zunehmenden Einwanderung coomassiefärbbarer Proteinbanden. In einem LAT-Assay mit Fragmenten des Gels konnte nur im ersten Zentimeter Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Verwendung von ASO-CoA als Marker konnte markiertes Protein in der Geltasche und in

der eingewanderten Proteinbande zeigen. Beide Markierungen konnten durch ACoA verdrängt werden und wiesen so auf eine mögliche Bindung des Photoaffinitätsmarkers an das LAT-Protein hin. Zur Spezifikation der eingewanderten Proteinbanden wurde diese in einer zweiten Dimension auf einem SDS-Gel getrennt. Dabei zeigte sich die Existenz mehrerer markierter Banden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich hierbei um Fragmente des LAT-Komplexes mit Acyl-CoA-bindenden Eigenschaften handelt.

Verschiedene Verfahren der Native PAGE sind von *Schägger & Jagow (1991)* beschrieben worden.

Eine von *Schägger & Jagow (1991)* beschriebene Ausnahme der nativen PAGE für Membranproteine ist die *Blue Native PAGE*. Proteine werden dabei mit Detergentien in Lösung gebracht und mit dem hydrophoben Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G umgesetzt. Der Farbstoff verwandelt die solubilisierten Membranproteine in negativ geladene Detergens/Protein/Farbstoff-Komplexe. Aufgrund elektrostatischer Abstoßung kommt es hier nicht zu einer Proteinaggregation und die biologische Aktivität bleibt erhalten. Während der Elektrophorese wird der Farbstoff kontinuierlich aus dem Puffer nachgeliefert.

Mit dieser Methode konnte jedoch keinerlei Abtrennung von Enzymaktivität erzielt werden.

Rekonstitution und Lipidabhängigkeit der LAT

Nach der Aufreinigung muß das Protein zur Rückerlangung der teilweisen oder vollen Aktivität in der Regel in eine Lipidumgebung gebracht werden. Eine Möglichkeit der schnellen und effizienten Rekonstitution in Gegenwart bestimmter Detergentien bietet die Verdünnung der mizellaren Lösung. Die Detergentskonzentration wird dabei bis zum Punkt der Proteoliposomenbildung reduziert. Eine etablierte Methode ist die Cholat-Verdünnung (*Ambesi et al., 1991*). Nach Extraktion der Enzymaktivität mit zwitter- oder nicht-ionischen Detergentien (in dieser Arbeit) wurde die Lösung mit Cholat und den Liposomen der Wahl versetzt. Danach erfolgte die Reduktion des Detergens durch Verdünnung (z. B. Dialyse, Volumenvergrößerung oder Detergens-Adsorber-Beads), wobei Cholat die Bildung von Protein-Lipidmizellenbildung durch Verhinderung der Proteinaggregation fördert. Die Hauptschwierigkeit lag in der Wahl der richtigen Liposomenzusammensetzung.

Die Bestimmung der optimalen Cholat-Konzentration ist in Abb. 3.2.7 wiedergegeben. Die Empfindlichkeit der LAT war im Vergleich zum OGP mit dem Cholat deutlich höher. Unter 12 mM Cholat war die Aktivität um 50% inhibiert. Damit ist Cholat kein, wie von *Trotter et al. (1982)* beschrieben, genereller Inhibitor, sondern könnte sich, wie von *Deka et al. (1986)* verwendet, als erheblich preiswerteres Detergens eignen. Im Gegensatz dazu beschrieb *Mukherjee et al. (1992)* sogar eine Stabilisierung der LAT-Aktivität unter 52 mM Na-Cholat.

Die Ermittlung der zur Rekonstitution geeigneten Lipide erwies sich als unbefriedigend. Die einfachste Methode in dieser Arbeit bestand in der Verwendung natürlicher

Erythrozytenlipide. Diese natürlichen Lipide sollten im Prinzip hauptsächlich zur Stabilisierung der LAT-Aktivität in aufgefangenen Fraktionen der chromatographischen Trennungen dienen. Die Ergebnisse (vgl. Abb.3.2.8) zeigten durchgängig einen inhibitorischen Effekt auf die LAT-Aktivität.

Die Bedeutung der Lipidumgebung für die LAT wurde besonders deutlich durch Experimente von *Deamer et al. (1982)* und *Fyrst et al. (1996)*. Der LAT wurden verschiedene Lysophospholipide und Acyl-CoAs angeboten. Das Enzym bildete bevorzugt mit seinen Substraten Vesikel und zeigte in diesem Lipidumfeld die höchste Aktivität. Negativ konnte sich unter diesen Bedingungen nur eine Produkthemmung auf die LAT auswirken. Hier konnten *Mukherjee et al. (1992)* zeigen, daß die LAT durch PC, PE, 1,2-DAG (Analogon) inhibierbar ist.

Die Wahl der Phospholipide für eine Rekonstitution in artifiziellen Membranen beschränkte sich auf die Kombinationen PC:PE:PS (5:3:1), PC:Ch:PE:SPM (10:1,5:1:1) und, wie von *Doolittle et al. (1982B)* für die ACAT verwendet auf PC:Ch (10:1,5).

Durch die Cholat-Verdünnungsmethode konnte kein Rekonstitutionseffekt erzielt werden. Die Verwendung von PC:PE:PS zeigte in den Protein:Liposomen-Verhältnissen 1:1 bis 1:10 keinerlei Effekt, während der Einsatz von PC:Ch in jedem Fall mit einem Totalverlust der Aktivität verbunden war. Durch PC:Ch:PE:SPM konnte der Verlust der Aktivität auf die Hälfte reduziert werden. Den inhibitorischen Effekt scheint das Cholesterin zu bewirken. Auch in Erythrozytenmembranen wurde der inhibitorische Effekt von Cholesterin gezeigt (*Allen et al., 1996*). Bei gleichzeitiger Gegenwart von PE und SPM erscheint die LAT-Aktivität stabilisierter. Möglicherweise sind PE und SPM für die Proteinkonformation der LAT bedeutend.

Anreicherung über konventionelle Chromatographie

Neben der Gelfiltration (*Hasegawa-Sasaki et al., 1980*) wurden zur LAT-Aufreinigung Affinitäts- und Ionenaustauscherchromatographie von *Sanjanwala et al. (1988 und 1989)* und *Deka et al. (1986)* sowie Dichtegradientenzentrifugation von *Gavino et al. (1982)* und *Fyrst et al. (1996)* verwendet.

In dieser Arbeit wurden weitere Reinigungsschritte im Hinblick auf den stark hydrophoben Charakter des OGP/NaCl-Überstands bzw. der LAT durchgeführt. Die Hydrophobizitätschromatographie sollte sich ideal zur Bindung eines solchen Proteins eignen. Es stellte sich dabei u.a. die Frage nach der Zugänglichkeit des Proteins für die hier verwendete Butylsäule in Komplexen mit geringen oder hohen Detergenkonzentrationen. Die Abb. 3.2.14 (A) zeigt, daß die Bindung von Proteinen des OGP/NaCl-Überstands unter Anwesenheit von 25 mM OGP an die Säule erfolgte. Dieses Resultat war zu erwarten, da durch die Verwendung von Detergentien auf hydrophobe Proteine selektiert wurde. Während bereits Protein ohne NaCl-Zusatz eluierte, wurde die LAT-Aktivität ab 1 M NaCl von der

Butyl-Säule eluiert. Der absteigende Gradient zeigte jedoch keinen scharfen Aktivitäts-Peak. Diese Tatsache weist auf ein komplexes Bindungsmuster der LAT hin. Verschiedene Proteine oder Lipide könnten mit der LAT assoziiert sein.

Die Zerlegung des OGP/NaCl-Komplexes durch Erhöhung der OGP-Konzentration auf 50mM führte im Aktivitätselutionsprofil zu einer Peakbildung (vgl. Abb. 3.2.15). Zwischen 1,7 und 0,4 M NaCl wurde LAT-Aktivität als Peak abgetrennt. Das überschüssige OGP könnte hier Begleitproteine und -Lipide ersetzt haben und eine selektivere Bindung über den hydrophoben LAT-Anteil an die Butylsäule ermöglichen. Für eine Kombination mit weiteren Säulen erschienen die Aktivitätsverluste zu hoch und eine Stabilisierung mit Erythrozytenlipiden war wenig effizient (vgl. Abb.3.2.16).

Mit einer Anionentauschersäule war es bei der pLAT möglich, die Hauptaktivität vom Hauptprotein zu trennen. Die LAT erwies sich dabei als negativ geladen. Es ergab sich die Frage, ob diese Trennung auch für den OGP/NaCl-Überstand nützlich sein könnte.

Im folgenden stellte sich heraus, daß die Bindung von LAT-Aktivität weitgehend unterdrückt wurde. Die Bindung konnte auch durch Anwesenheit von OGP in allen Puffern nicht verbessert werden. Stattdessen wurde die Proteinbindung an die hier verwendete SuperQ-Säule vollständig verhindert. Negativ geladene Domänen der LAT könnten durch die Anwesenheit von Detergens für eine Bindung an den Anionentauscher unzugänglich sein.

Eine vielversprechende Reinigungsmethode stellte die Hydroxylapatitchromatographie dar. Aus Abb. 3.2.118 ist zu erkennen, daß die LAT-Aktivität (aus dem OGP/NaCl-Überstand) als basisches Protein eluiert. Im Vergleich zur pLAT wurde bis zum Zusatz von 1 M KCl keine LAT-Aktivität eluiert. In gewisser Weise widerspricht dieses Resultat der Selektion auf hydrophobe Proteine durch Detergens. Es scheint hier aber eine selektive Bindung basischen Proteins vorzuliegen. Dieses Ergebnis wurde bekräftigt durch die Verwendung von CHAPS-ÜS auf der Hydroxylapatit-Säule (vgl. Abb. 3.2.19). Der CHAPS-ÜS zeigte ebenfalls einen basischen LAT-Anteil, der durch Chlorid-Ionen eluiert wurde. Zunächst wurde LAT-Aktivität unter Phosphationen eluiert, was für einen sauren Charakter spricht. Möglicherweise handelt es sich hierbei um die Bindung von Acyltransferasen unterschiedlicher Spezifität und damit auch unterschiedlicher Umgebung.

Die Hydroxylapatit-Säule ist neben der Gelfiltration eine geeignete Methode zur Vorreinigung der LAT, doch wurde die Idee der Aufreinigung über eine präparative Hydroxylapatitsäule aufgrund der hohen Aktivitätsverluste verworfen.

Fettsäuren als Liganden in der Affinitätschromatographie

Die Methoden der konventionellen Chromatographie zeigten, daß Gelfiltration und Hydroxylapatit-Chromatographie für eine weitere Vorreinigung der LAT aus dem OGP/NaCl-Überstand geeignet sind. Die Messung der spezifischen Aktivität zeigte jedoch

keinerlei Anreicherungs-effekt. Somit mußte nach selektiveren Methoden zur Reinigung der LAT gesucht werden.

Die Affinitätschromatographie ist dabei die Methode der Wahl, da das Zielprotein über einen spezifischen Liganden abgetrennt werden kann. Zur Aufreinigung von Acyltransferasen wurden häufig unspezifische Matrizen zur Proteinbindung eingesetzt. So wurde die Trennung einer LPI- von einer LPC-spezifischen Acyltransferase auf einer „Matrex gel green A“-Säule erreicht (*Sanjanwala et al., 1989*) und die Anreicherung einer LPC-spezifischen Acyltransferase über HDL-Affinitätschromatographie (engl.: **high-density-lipoprotein**) (*Subbaiah et al., 1980*). Die Verwendung spezifischer Fettsäure-Liganden wurde erfolgreich zur Aufreinigung der Acyl-CoA: Glycerin-3-phosphat Acyltransferase (*Eccleston et al., 1995*) und zur Isolierung der Sphingosin N-Acyltransferase (Ceramid Synthase) (*Shimeno et al., 1998*) verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach neuen Fettsäureliganden für die Affinitätschromatographie gesucht. Spezifische Fettsäure-Liganden wurden im Rahmen der LAT-Aufreinigung in unserer Arbeitsgruppe zuvor nur in Form von Photoaffinitätsmarkern eingesetzt (*Gehring et al., 1998*).

Als attraktives Trennungsprinzip erschienen die Eigenschaften des Trägermaterials Transil[®] der Fa. Nimbus. Ein Silicaträger wurde auf einem Phosphatidylcholin-Hintergrund zu 5% mit 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-PC beschichtet. Die LAT sollte das LPC als Substrat erkennen und entweder unter Erhöhung der Umgebungstemperatur (Phase-Transition) oder herkömmlich durch einen Ionengradient eluieren. Eine spezifische Bindung an dieses Medium konnte weder mit der pLAT noch mit dem solubilisierten OGP/NaCl-Überstand erreicht werden. Da das Silicamaterial mit den Lipiden in einer Schicht bedeckt ist, könnte die fehlende Bindung auf die schlechte Verfügbarkeit des LPC zurückzuführen sein. Ein Abstandhalter könnte in diesem Fall Abhilfe leisten.

Kompetitionsexperimente zeigten, daß Ölsäure, Palmitoyl-CoA und Palmitinsäure von der LAT gebunden werden können. Somit eignen sich diese als Fettsäure-Liganden für eine Kopplung an verschiedene Affinitätsmatrizen.

Zunächst wurde die Palmitinsäure auf die Eignung als Fettsäure-Ligand an EAH-Sepharose 4B untersucht. Die Abb. 3.2.23 zeigt, daß eine Proteinbindung prinzipiell erfolgte. Unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen wurde LAT-Aktivität eluiert, aber nicht vom Hauptprotein-Peak separiert. Dies deutet auf verschiedene Begleitproteine oder -lipide hin, zumal eine Kombination von NaCl mit Detergens nochmals einen großen Teil der Aktivität zu eluieren vermochte, d. h. die Bindung könnte auf rein hydrophober Natur basieren.

Der Vergleich mit einer Kontrollsäule ohne Ligand zeigte ein identisches Elutionsverhalten. Die Bindung von LAT-Aktivität war dabei noch höher. Mit einem feineren NaCl-Gradienten konnte die Trennung verbessert werden. Das Ergebnis suggeriert, daß die Bindung von Protein und Aktivität sehr unspezifisch erfolgt. Eine hydrophobe Bindung über den

Abstandhalter von 10 C-Atomen Länge ist dabei ebenso wie die Bindung an die Sepharosematrix denkbar.

Eine Auftrennung der Fraktionen auf dem SDS-PAGE-Gel und eine Markierung mit dem Photoaffinitätsmarker ASO-CoA zeigten die Anreicherung verschiedener Proteine in den aktiven gegenüber den nichtaktiven Fraktionen. Die Markierung von Proteinen im Trenngel mit ASO-CoA war dagegen nur mit einer nichtaktiven Fraktion möglich. Besonders aktive Fraktionen zeigten in der Photoaffinitätsmarkierung keinen Unterschied zu weniger aktiven Fraktionen. Ausreichende Proteinmengen zur Sequenzierung der angereicherten Banden konnten aufgrund der geringen Selektivität nicht erhalten werden. Es wurde daher versucht, weitere Liganden zu finden.

Palmitoyl-CoA-Agarose sollte eine Alternative zur Sepharose-Matrix sein. Eine Bindung von LAT-Aktivität und dem Hauptprotein konnte durch Elution mit 1M NaCl nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß eine Abtrennung der Aktivität vom Hauptprotein mit einem OGP-Gradienten möglich war (Abb. 3.2.29). Im SDS-Gel konnte keine bedeutende Anreicherung von Proteinbanden, speziell in der aktiven Fraktion, ermittelt werden. In dieser wurde lediglich eine 65 kDa-Bande im Vergleich zu anderen Fraktionen sichtbar. Problematisch zeigte sich die unzureichende Reproduktion der Trennung, da sich das Maximum der Aktivität nach mehreren Läufen verschob. Die Anreicherung im SDS-Gel hatte ihre Limitierung durch die Trennkapazität des Gels. Eine Abtrennung weitere Proteine wäre in diesem Zusammenhang unerlässlich.

Als aussichtsreichster Fettsäure-Ligand für die Affinitätschromatographie erschien die Ölsäure. Sie war daher auch Basis für die Synthese des Photoaffinitätsmarkers (ASO-CoA). Eine relativ spezifische Bindung von ASO-CoA an das katalytische Zentrum der LAT konnte durch die Verdrängbarkeit mit ACoA bestätigt werden (*Gehring et al., 1998*).

Kerkhoff et al. (1998) konnten zeigen, daß CoA die LAT nicht direkt inhibiert und daß AcylCoA über die Acylketten in hydrophoben Taschen gebunden werden mußte. Somit würde CoA dem katalytischen Zentrum zur Bildung eines Übergangszustands angeboten.

Die Ölsäure war als Vorstufe des ASO-CoA omega-terminal mit einer Aminogruppe derivatisiert worden. Der Vorteil eines solchen Fettsäureliganden liegt damit in der möglichen Bindung der freien Carboxylgruppe in der katalytischen Bindungsseite der LAT. Ähnliche Versuche mit omega-Amino-derivatisierten Fettsäuren wurden in der Affinitätschromatographie zur Reinigung von Lipoxygenasen (*Allen et al., 1977*) und Sulfotransferasen (*Kamino et al., 1992*) eingesetzt. Des Weiteren wurden von *Lewin et al. (1999)* Bestandteile des katalytischen Zentrums der GPAT durch Mutagenese charakterisiert. Die Bindung der Acyl-CoA-Gruppen über das Carboxyende wurde prognostiziert. Da Sequenzhomologien zwischen GPATs und LPAATs bestehen, liegt ein ähnlicher Mechanismus auch für die LAT nahe.

Die Kopplung der Amino-Ölsäure an aktivierte CH-Sepharose 4B zeigte im Vergleich zu einer Kontrollsäule ohne Ligand eine deutliche Verringerung der unspezifischen Proteinbindung. Dies ist vermutlich Ursache des verkürzten Abstandhalters (6 C-Atome Länge) im Vergleich zur ACH-Sepharose 4B und der Spezifität für primäre Aminogruppen. Eine weitere Reduktion der unspezifischen Bindung konnte durch die Verwendung von 0,5 % (w/v) OGP in allen Puffern erreicht werden. Die LAT-Aktivität konnte jedoch auch hier nicht vom Hauptprotein separiert werden.

Durch die Kopplung von 18-Amino-Ölsäure an NHS aktiviertes HiTrap-Säulenmaterial sollte der Einfluß eines längeren (12 Atome), aber hydrophilen Abstandhalters untersucht werden. Die HiTrap-Säulen haben den Vorteil der Kompatibilität mit herkömmlichen FPLC-Anlagen. Der Vergleich einer ligandengekoppelten Säule mit einer ohne Ligand zeigte eine deutliche Reduktion der unspezifischen Bindung. Die Hauptaktivität konnte mit 2 M NaCl eluiert, aber nur leicht vom Hauptprotein abgetrennt werden. Ein kleiner Teil der LAT-Aktivität ließ sich auch schon unter 0,5 M NaCl eluieren. Hier stellt sich die Frage, ob es eine Trennung aufgrund spezifischer Bindung oder aber aufgrund der Hydrophobizität unterschiedlicher Lipide/Protein/LAT-Komplexe ist. Eine steigende NaCl-Konzentration könnte die Reaggregation verschiedener hydrophober Komplexkomponenten der LAT inklusive essentieller Lipid- und/oder Proteinbestandteile bewirken.

Die verringerte Hydrophobizität des Abstandhalters scheint in diesem Fall für die Vermeidung der unspezifischen Bindung von LAT-Aktivität deutlich wichtiger zu sein als dessen Länge.

Im SDS-Gel (vgl. Abb.3.2.38) korrelierte die Anreicherung von Proteinbanden nicht mit dem Aktivitätsverlauf (vgl. Abb. 3.2.37). Möglicherweise ist das LAT-Protein in dieser Konzentration (3,5 µg/Bahn aus der aktiven Fraktion 14) noch nicht nach Silberfärbung sichtbar.

Um eine Anreicherung von LAT-Protein zu erkennen, wurden die Fraktionen 13 und 14 aus Abb. 3.2.37 (B) mehreren Säulenläufen vereinigt und über Millipore-Konzentratoren konzentriert. Im Bereich unter 90 Da kam es aufgrund vieler Begleitproteine zu einer schlechteren Auftrennung ohne Anreicherung spezieller Banden. Oberhalb von 100 kDa zeigte sich eine stark angereicherte 160 kDa Bande, die ebenfalls in der Gelfiltration angereichert wurde und mit der Aktivität korrelierte. Die Sequenzierung ergab das α -2-Makroglobulin, dessen Funktion nicht vollständig geklärt ist.

α -2-Makroglobulin

Neben der Bindung und Inaktivierung von Proteasen im Serum (*Wittwer et al., 1998*) wird α -2-Makroglobulin auch eine Transportfunktion für Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Lipoproteine zugeschrieben (*Krimbou et al., 1998*). Dabei könnte der Lipidtransport über eine nichtkovalente Assoziation mit Apolipoprotein E auch von Bedeutung für die

Regulation der LAT sein. Die Aktivierung der Lecithin-Cholesterin Acyltransferase (LCAT) in humanem Plasma konnte durch die Apolipoproteine A-I, B, C-I und E gezeigt werden (*Liu et al., 1992 und 1993*). Andererseits wurde in Maus-Makrophagen eine schnelle Freisetzung von Eicosanoiden unter der Einwirkung von α -2-Makroglobulin gesehen (*Uhing et al., 1991*). Dieser Effekt wäre durch einen direkten Einfluß auf den Deacylierungs/Reacylierungszyklus erklärbar. Prostaglandine wie PGE₁ stehen desweiterm im Verdacht, bei Ratten den α -2-Makroglobulin-Spiegel in der Leber und die Freisetzung ins Plasma zu erhöhen (*Anbalagan et al., 1984*). Ein positiver Feedback-Mechanismus wäre hier möglich.

Eine Verbesserung der Trennleistung sollte über einen OGP-Gradienten erreicht werden. Tatsächlich konnte LAT-Aktivität mit OGP-Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 % (w/v) vor dem Hauptprotein eluiert werden. Fraglich bleibt, ob die Elution mit OGP spezifische Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial oder aber hydrophobe Wechselwirkungen von aktiven LAT/Protein- oder LAT/Lipid-Fragmenten verringert.

Problematisch zeigte sich allerdings die geringe Enzymstabilität. In Abb. 3.2.40 wurde ca. 1 % der Ausgangsaktivität wiedergefunden. Zur Stabilisierung sollte das natürliche Substrat Lysophosphatidylcholin in einer Konzentration von 50 μ M dienen. Der fluorimetrische Assay hatte eine Stabilität des LAT-Proteins bis zu einer Konzentration von 100 μ M LPC ergeben. Ein stabilisierender Effekt auf die LAT-Aktivität während und nach der Elution wurde nicht festgestellt.

Neben den Fettsäure-Liganden sollten synthetische Inhibitoren der LAT des Yamanouchi Research Institutes ,Oxford, UK, zur Kopplung an Affinitätsmatrizen eingesetzt werden. Aufgrund patentrechtlicher Probleme bleibt dieses Ziel eine Option für die Zukunft. *Weltzien et al. (1979)* wiesen in diesem Zusammenhang auf die inhibitorischen Eigenschaften von Lysophosphatidylcholinanaloga auf die LAT hin.

Als potentieller Ligand würde sich außerdem Arachidonoyl-CoA anbieten, wobei die Stabilität der vier Doppelbindungen limitierend wirken könnte. Ein interessanter Ansatz wäre die Kopplung eines Enzyms oder Acyl-CoA-Bindungsproteins, wie sie für eine Hydrolase von *Rogers et al. (1984)* durchgeführt wurde. Hierzu müßten zunächst mehr Informationen über bestehende Interaktionen erlangt werden.

Kombination chromatographischer Säulen

Die Kombination erfolgreicher Aufreinigungsschritte ist Ziel eines Aufreinigungskonzeptes. Die solubilisierte Form der LAT erwies sich, trotz ihrer Stabilität im OGP/NaCl-Komplex, als sehr empfindlich gegenüber der weiteren chromatographischen Auftrennung. Der Aktivitätsverlust betrug in der Regel über 90 %, speziell im Bereich der Affinitätschromatographie. Die Kombination verschiedener Reinigungsschritte unter Erhalt der LAT-Aktivität war somit prinzipiell in Frage gestellt.

Aktive Fraktionen der Gelfiltration und der Hydroxylapatit-Chromatographie wurden mit der Palmitoyl-CoA-Sepharose und der 18-Amino-Ölsäure-Sepharose (NHS) kombiniert. In beiden Fällen ging die Aktivität größtenteils verloren.

Ursache dieser Inhibition könnte z. B. die Abtrennung von Kofaktoren durch Gelfiltration und Hydroxylapatit-Chromatographie im ersten Schritt und die Konformationsänderung des LAT-Proteins bei der Bindung essentieller Lipide an die Affinitätsäulen im zweiten Schritt sein. Ein proteolytischer Abbau konnte durch die Verwendung eines Protease-Inhibitorcocktails weitgehend ausgeschlossen werden.

Zweidimensionale Elektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese kombiniert die Trennleistungen der isoelektrischen Fokussierung in der ersten mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der zweiten Dimension. Dabei ist das Verfahren besonders gut für die Trennung komplexer Gemische aus Gewebe und Zellen geeignet. In dieser Arbeit sollte die 2D-Elektrophorese als Alternative zum SDS-Laemmli-Gel für die Trennung nahe beieinander liegender Proteine (MW-Bereich: 50-90 kDa) etabliert werden. Außerdem sollte der Erfolg der bisherigen Aufreinigungszustand abgeschätzt werden.

Zunächst wurde mit einem Millipore-System gearbeitet. Dieses System hat den entscheidenden Nachteil, daß die notwendigen Ampholyte nicht in der Gelmatrix fixiert sind. Eine Kontrolle des aufgebauten pH-Gradienten nach der isoelektrischen Fokussierung zeigte nicht das erwartete Spektrum. Außerdem erwies sich die Handhabung als etwas kompliziert. Mit dem IGPphor-System der Fa. Amersham Pharmacia Biotech wurde die Technik deutlich vereinfacht. Der entscheidende Vorteil liegt hier in der Immobilisierung des pH-Gradienten auf ein Plastikträgermaterial („Dry-Strips“ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Die Überprüfung des korrekten pH-Gradienten wurde hier nicht durchgeführt, sollte aber innerhalb einer gewissen Chargen-Toleranz den Ansprüchen genügen.

Als besonders problematisch zeigen sich Membranproteine während der Probenvorbereitung für die Elektrophorese und während der 2D-Elektrophorese. Die Auflösung der 2D-Elektrophorese kann entscheidend durch die Methoden der Solubilisierung, die Art der Zellaufschließung, der Proteinkonzentration, der Wahl bestimmter Detergentien oder einfach der Zusammensetzung des Probenpuffers beeinflusst werden.

Die Hauptschwierigkeit bereitete daher auch in dieser Arbeit die Solubilisierung der Probe. Da die meisten Proben Detergentien und vor allem hydrophobe Proteine und störende Lipide enthielten, wurden die Proben vor Verwendung nach *Wessel & Flügge (1983)* gefällt. Das somit lipidfreie Protein wurde dann solubilisiert. Zur Lösung der Proteinpellets wurden im Lyse-Puffer neben dem zwitterionischen CHAPS (4 %, (w/v)) und 8 M Harnstoff auch (nach *Rabilloud et al., 1998*) das chaotrope Reagens Thioharnstoff (2 M) eingesetzt. Das Rehydrieren des Trägers wurde dabei in Anwesenheit der Proteinprobe durchgeführt. Dies hat

den Vorteil der geringeren Präzipitation, da die Probe weniger konzentriert aufgetragen wird (*Molloy et al., 1998*). Eine Adsorption am Trägermaterial und im Rehydrationsgefäß kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden; sie könnte zum Proteinverlust führen, wie es für Konzentrate der Hydroxylapatit-Chromatographie auch der Fall war.

Das Ausgangsmaterial der Proteinreinigung (vgl. Abb. 3.2.48) (Ausgangsmembranen: CM) zeigte im Vergleich zum NaCl-Überstand (pLAT), CHAPS-ÜS und OGP/NaCl-Überstand die meisten Proteine bei einer aufgetragenen Gesamtmenge von 200 µg. Im Verlauf der Fraktionierung kam es offenbar zur Abreinigung bestimmter Proteingruppen. Diverse Spots zeigten sich aber auch in allen Gelen, was auf eine fehlende Spezifität der Fraktionierung hinsichtlich dieser Proteine oder auf Proteine mit verschiedener Lokalisation schließen läßt.

Der OGP/NaCl-Überstand war Startmaterial der meisten chromatographischen Schritte dieser Arbeit. Die Anzahl der Proteinspots (vgl. Abb. 3.2.51) spiegelt die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auftauchende Problematik der mangelnden Auflösung für höhere Proteinkonzentrationen (bei nicht-selektiver Trennung) wider. Speziell im Bereich zwischen 50 und 90 kDa lagen viele Proteine auf einer MW-Ebene.

Die Bestimmung von LAT-Kandidatenproteinen durch Spot-Substraktion verschiedener mehr oder weniger aktiver Proteinfractionen führte in Abb. 3.2.48 zu einer Übereinstimmung einer Spotansammlung zwischen 67 und 80 kDa. Eine weitere Auftrennung in diesem Bereich könnte durch die Wahl eines engeren pH-Gradienten erreicht werden. Ohne spezifischen Marker und die Gewährleistung, daß alle eingesetzten Proteine aufgetrennt werden, erscheinen jedoch weitere Anstrengungen wenig erfolgversprechend.

Immunologische Detektion

Neben dem klassisch-biochemischen Weg der Proteinaufreinigung kann ein Protein auch mittels immunologischer Hilfsmittel identifiziert werden. Mitarbeiter des Yamanouchi Research Institutes, Oxford, UK, hatten die LAT aus Rattenlebermikrosomen nach einer Vorschrift von *Fyrst et al. (1996)* in Vesikeln auf einem Dichtegradienten getrennt. Dabei ergaben sich zwei Kandidatenproteine (60 und 20 kDa). Beide wurden zur Herstellung des schon erwähnten Antikörpers („Kaninchen-anti-CoA-abhängige Acyltransferase Antikörper“) verwendet. Im Rahmen einer Kooperation konnte der Antikörper in dieser Arbeit eingesetzt und zur Detektion von geblottetem Protein unterschiedlicher LAT-Fractionen verwendet werden (vgl. 3.2.53). Alle Fraktionen (CM bis zur 18-Amino-Ölsäure (NHS)-gereinigten Fraktion) zeigten dabei zwei deutliche Banden (ca. 55 und 60 kDa), die entsprechenden Proteinbanden zugeordnet werden konnten. Eine Sequenzierung ergab allerdings für die 60 kDa-Bande die Monoaminoxidase A und für die zweite Bande (55 kDa) das 57 kDa große Mannose-spezifische Lektin (ERGIC 53) sowie das 66 kDa Protein p63. Da die Lipide der gesamten Zelle am ER synthetisiert werden, könnte ein direkter regulativer Einfluß über p63 und ERGIC 53 bestehen.

P63 und ERGIC 53

p63 und ERGIC 53 sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Ihre Funktionen sind bislang nicht genau geklärt. Während ERGIC 53 lange Zeit lediglich als Marker des intermediären Kompartiments im Endoplasmatischen Retikulum galt (*Arar et al., 1995*) werden ihm jetzt auch eine Chaperonfunktion beim Transport bestimmter Glykoproteine vom ER zum Golgiapparat zugeschrieben (*Nichols et al., 1998* und *Vollenweider et al., 1998*).

Das Protein p63 scheint stabil in der Membran des ER verankert zu sein. Eine Funktion ist der Transport von Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat (*Schweizer et al., 1993*). Neuere Untersuchungen zeigten, daß p63 das erste integrale Membranprotein ist, welcher eine Organellenmembran direkt mit Mikrotubuli verbindet. Hierdurch kann das ER entlang der Mikrotubuli positioniert werden (*Klopfenstein et al., 1998*).

Mit dem Antikörper wurde vom Yamanouchi Research Institute des weiteren eine U937 cDNA-Datenbank analysiert, wobei eine 1,7 Kb große Sequenz gefunden wurde. Über die 5'RACE-Methode konnte die vollständige Sequenz erhalten werden. Die klonierte cDNA hat eine 98 %ige Homologie mit dem KIAA0661-Protein, einer Proteinfamilie unbekannter Funktion. Das KIAA-Protein zeigt keinerlei Homologie zu bekannten Acyltransferasen oder ACBP- bzw. FABP-Sequenzen.

Die gezeigten Ergebnisse suggerieren, daß der verwendete Antikörper keinerlei Spezifität gegenüber der LAT besitzt. Diese Annahme wird u. a. unterstützt durch die Methode zur Herstellung des Antikörpers. Es wurde eine Immunisierung von Kaninchen mit zwei Proteinebanden einer Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Möglicherweise wurde gegen verschiedenste Proteine immunisiert. Ein Versuch zur direkten Inhibition der LAT mit dem Antikörper war nicht erfolgreich. Letztlich spricht gegen die Spezifität des Antikörpers auch die weiterhin ausstehende Veröffentlichung einer Sequenz der von *Fyrst et al. (1996)* postulierten LAT.

Die bisher publizierten Daten und die Erkenntnisse aus dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß sich ein weiterer proteinbiochemischer Ansatz zur Aufreinigung der LAT sehr schwierig gestalten dürfte. Obwohl Homologieklonierungen über die LPAAT bisher keinen Erfolg zeigten, deuten neuere Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Acyltransferasen darauf hin, daß molekularbiologische Methoden wahrscheinlicher zum Ziel der LAT-Charakterisierung führen könnten.

5. Zusammenfassung

Die Lysophosphatidylcholin: Acyl-CoA-O-Acyltransferase (LAT) ist an der Kontrolle der Fettsäurezusammensetzung der Membranphospholipide und des Spiegels an unveresterter Arachidonsäure beteiligt, und spielt möglicherweise eine Rolle bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen, die mit einer veränderten Zellproliferation einhergehen. Das Enzym wurde als integrales Membranprotein beschrieben, konnte bisher aber noch nicht isoliert und sequenziert werden.

Diese Arbeit konnte neue Indizien für die Bedeutung der LAT bei Tumorzellen liefern. Es wurde gezeigt, dass der Einbau von Linolsäure in T-Zelltumorkulturen im Vergleich zu normalen T-Lymphozyten signifikant erhöht ist. Dies traf im Fall der CEM- und der Patientenzelllinie 1 auch für die direkt gemessene LAT-Aktivität zu.

Des Weiteren wurde ein neues Konzept zur Aufreinigung der Membran-integrierten LAT erstellt. Zu dem Aufreinigungsschritten gehörten, neben der Membranpräparation aus humaner Plazenta, der Einsatz der Detergentien CHAPS und OGP zur Solubilisierung der LAT sowie in hohen Konzentrationen zur Auflösung des LAT-Protein-Lipid-Komplexes. Die Proteinanalyse wurde zum Teil mittels konventioneller Chromatographie durchgeführt, wobei außer der Hydrophobizitäts- und Anionenaustauscherchromatographie auch die Gelfiltration und Hydroxylapatitsäulen zum Einsatz kamen.

Palmitinsäure, Palmitoyl-CoA und 18-Amino-Ölsäure wurden in der Ligandenchromatographie in Kombination mit verschiedenen Säulenmatrizen auf ihre Eignung zur LAT-Aufreinigung getestet.

Das Enzym konnte durch Detergentien stabil aus der Membran extrahiert und über Monate gelagert werden. Es erwies sich als basisches Protein in einem sehr stabilen Komplex von mehr als 240kDa mit Lipiden und weiteren Proteinen. Der notwendige Einsatz von hohen Detergentsmengen führte zu einem raschen und weitgehenden Aktivitätsverlust, so daß eine Reinigung durch die Kombination chromatographischer Schritte sehr erschwert wurde. Dies weist auf eine bedeutende Rolle der Lipidumgebung beim Konformations- und Aktivitätserhalt der LAT hin.

Aus der Ligandenchromatographie und der immunologischen Detektion wurden insgesamt vier Kandidatenproteine ausgewählt und sequenziert. Dabei wurden die Monoaminoxidase-A, das α -2-Makroglobulin und die Proteine ERGIC-53 und p63 identifiziert.

Neben dem möglichen regulatorischen Einfluß von p63 wurde ein direkter Einfluß des α -2-Makroglobulin auf den Deacylierungs/Reacylierungs-Zyklus und eine aktivierende Wirkung von Apolipoproteinen (über den Transporteur α -2-Makroglobulin) diskutiert.

Suchbegriffe: Acyllysophosphatidylcholin Acyltransferase, FPLC-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, Aminoölsäure, Rekonstitution, Membranprotein, Fettsäure-Remodelling

6. Referenzen

- Abraham, S., Hillyard, L.A. (1983) Effect of dietary 18-carbon fatty acids on growth of transplanted mammary adenocarcinomas in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 71: 601-605.
- Allen, J.C., Eriksson, C., Galpin, J.R. (1977). Affinity chromatography of lipoxygenases. *Eur. J. Biochem* 73: 171-177.
- Allen, D.W., Manning, N. (1996) Cholesterol-loading of membranes of normal erythrocytes inhibits phospholipid repair and arachidonyl-CoA: 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyltransferase. A model of spur cell anemia. *Blood* 87: 3489-3493.
- Ambesi, A., van Alstyne, E.L., Bagwell, E.E., Lindenmayer, G.E. (1991) Sequential use of detergents for solubilization and reconstitution of a membrane ion transporter. *Anal. Biochem.* 198: 312-317.
- Anbalagan, K., Sadique, J. (1984) Role of prostaglandins in acute phase proteins in inflammation. *Biochem. Med.* 31: 236-245.
- Arar, C., Carpentier, V., Le Caer, J.P., Monsigny, M., Legrand, A., Roche, A.C. (1995) ERGIC-53, a membrane protein of the endoplasmic reticulum-golgi. *Biol. Chem.* 270: 3551-3553.
- Arche, R., Estrada, P., Acebal, C. (1987) The Kinetic Mechanism of acyl-CoA: lysolecithin acyltransferase from rabbit lung. *Arch. Biochem. Biophys.* 257:131-139.
- Arthur, G, Page, L.L., Zaborniak, C.L., Choy, P.C. (1987) The presence of 1-radyl-glycerophosphoethanolamine activity in Guinea-Pig heart mitochondria. *Biochem. J.* 65:1016-21.
- Baker, R.R., Chang, H. (1981) The acylation of 1-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine by glial and neuronal nuclei and derived neuronal nuclear envelopes: a comparison of nuclear and microsomal membranes. *Can. J. Biochem.* 59: 848-856.
- Batenburg, J.J., Longmore, W.J., Klazinga, W., van Golde, L.M. (1979) Lysolecithin acyltransferase and lysolecithin: lysolecithin acyltransferase in adult rat lung alveolar type II epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 573: 136-144.
- Bauw, G., van Damme, J., Puype, M., Vanderkerckhove, J., Gesser, B., Ratz, G.P., Lauridsen, J.B., Cells, J.E. (1989) Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7701-7705.
- Bernadi, G. (1971) *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 22: 225-237.
- Biermann, J., Just, W.W., Wanders, R.J.A., van den Bosch, H. (1999) Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes. *Eur. J. Biochem.* 261: 492-499.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37: 911-917.

- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 197-203.
- Borgeston, C.E., Pardini, L., Pardini, R.D., Reitz, R.C. (1989) Effects of dietary fish oil on human mammary carcinoma and on lipid-metabolizing enzymes. *Lipids* 24: 290-295.
- Butcher, R.D., Wojcik, S.J., Lints, T., Wilson, T., Schofield, P.C., Ralph, R. (1993) Arachidonic acid, a growth signal in murine P815 mastocytoma cells. *Cancer Res.* 53: 3405-3410.
- Cailla, H.L., Vannier, C.J., Delaage, M.A. (1976) Guanosine 3', 5'-cyclicmonophosphate assay at 10^{-15} -mole level. *Anal. Biochem.* 70: 195-202.
- Chattopadhyay, A. (1996) Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: implications in receptor solubilization. *FEBS Lett.* 391: 199-202.
- Chattopadhyay, A., London, E. (1984) Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal. Biochem.* 139: 408-412.
- Chaudry, A., McClinton, S., Moffat, L.E., Wahle, K.W. (1991) Essential fatty acid distribution in the plasma and tissue phospholipids of patients with benign and malignant prostatic disease. *Br. J. Cancer.* 64: 1157-1161.
- Chilton, F.H., Fonteh, A.N., Surette, M.E., Triggiani, M., Winkler, J.D. (1996) Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1299: 1-15
- Choy, P.C., Chan, A.C. (1989) Phosphatidylcholine metabolism in isolated rat heart: modulation by ethanol and vitamin E. *Biochim. Biophys. Acta* 1005: 225-232.
- Choy, P., Tardi, P., Mukherjee, J. (1992) Lysophosphatidylcholine acyltransferase. *Methods. Enzymol.* 209: 80-86.
- Colard, O., Bard, D., Bereziat, G., Polonovski, J. (1980) Acylation of endogenous phospholipids and added lysoderivatives by rat liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 618: 88-97.
- Dahiya, R., Boyle, B., Goldberg, B.C., Yoon, W.H., Konety, B., Chen, K., Yen, T.S., Blumenfeld, W., Narayan, P. (1992) Metastasis associated alterations in phospholipids and fatty acids of human prostatic adenocarcinoma cell lines. *Biochem. Cell. Biol.* 70: 548-551.
- Das, S.K., Banerjee, A.B. (1977) Lipolytic enzymes of trichophyton rubrum. *Sabouraudia* 15: 313-323.
- Deamer, D.W., Boatman, D.E. (1980) An enzymatically driven membrane reconstitution from solubilized components. *J. Cell. Biol.* 84: 461-7.
- De Grip, W.J., van Oostrum, J., Bovee-Geurts, P.H., van der Stehen, R., van Amsterdam L.J., Groesbeck, M., Lugtenburg, J. (1990) 10,20-Methanorhodopsins (7E,9E, 13E)- 10, 20-methanorhodopsins and (7E, 9E, 13Z)-10, 20- methanorhodopsin. 11-cis-locked rhodopsin analog pigments with unusual thermal and photo-stability. *Eur. J. Biochem.* 191: 211-220.

- Deka, N., Sun, G.Y., MacQuarrie, R. (1986) Purification and properties of acyl-CoA:1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine-O-acyltransferase from bovine brain microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 554-563
- Deuel, H.J. (ed.) (1951) The lipids, their chemistry and biochemistry, Vol.1, Chemistry, Interscience Publishers, New York, 405-418
- Devor, K.A., Mudd, J.B. (1971) Biosynthesis of PC by enzyme preparations from spinach leaves. *J. Lipid. Res.* 12: 412-419
- Doolittle, G.M., Chang, T.Y. (1982) Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in chinese hamster ovary cells. Enzyme activity determined after reconstitution in phospholipid/cholesterol liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 713: 529-537
- Doolittle, G.M., Chang, T.Y. (1982B) Solubilization, partial purification and reconstitution in phosphatidylcholine-cholesterol liposomes of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 21: 674-679
- Eccleston, V.S., Harwood, J.L. (1995) Solubilization, partial purification and properties of acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochim. Biophys. Acta* 1257: 1-10.
- Eibl, H., Hill, E.E., Lands, W.E.M. (1969) The subcellular distribution of acyltransferases which catalyze the synthesis of phosphoglycerides. *Eur.J.Biochem.* 9:250-258.
- Ellmann, G, Lysko, H. (1979) A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 93: 98-102.
- Estrada, P., Acebal, C., Arche, R. (1985) Mechanism of the reaction catalyzed by acyl-CoA: lysolecithin acyltransferase from rabbit lung. pH studies and chemical modification. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 25: 534-541
- Faas, F.H., Dang, A.Q., Pollard, M., Hong, X., Fan, K., Luckert, P., Schutz, M. (1996) Increased phospholipid fatty acid remodelling in human and rat prostatic adenocarcinoma tissues. *J.Urol.* 156: 243-248.
- Flesch, I., Schonhardt, T., Ferber, E. (1989) Phospholipases and acyltransferases in macrophages. *Klin. Wochenschau* 67: 119-122.
- Fuse, L., Iwanaga, T., Tai, H.-H. (1989) Phorbol ester, 1,2-diacylglycerol, and collagen induce inhibition of arachidonic acid incorporation into phospholipids in human platelets. *J. Biol.Chem.* 264, 3890-3895.
- Fyrst, H., Knudsen, J., Schott, M.A., Lubin, B.H., Kuypers, F.A. (1995) Detection of acyl-CoA-binding protein in human red blood cells and investigation of its role in membrane phospholipid renewal. *Biochem. J.* 306: 793-799
- Fyrst, H.; Pham, D.V.; Lubin, B.H.; Kuypers, F.A. (1996) Formation of vesicles by the action of acyl-CoA:1-acyllysophosphatidylcholine acyltransferase from rat liver microsomes:

- optimal solubilization conditions and analysis of lipid composition and enzyme activity. *Biochemistry* 35: 2644-2650
- Gavino, V.C., Deamer, D.W. (1982) Purification of acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine acyltransferase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 14: 513-525.
- Gehring, L., Haase, D., Habben, K., Kerkhoff, C., Meyer, H.H., Kaefer, V. (1998) Synthesis of an unsaturated fatty acid analogue (18-(4'-azido-2'-hydroxybenzoylamino)-oleic acid) and its interaction with lysophosphatidylcholine: acyl-CoA-O-acyltransferase. *J. Lipid Res.* 39, 1118-1126.
- Gehring (1997) *Promotionsarbeit* (rer.nat.) Uni Hannover
- Goppelt, M., Eichhorn, R., Krebs, G., Resch, K. (1986) Lipid composition of functional domains of the lymphocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 854: 184-190.
- Gorbunoff, M.J., Timasheff, S.N. (1984) The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. Mechanism. *Anal. Biochem.* 136: 440-445.
- Grataroli, R., Termine, E., Portugal, H., Pauli, A.M., Lafont, H., Nalbone, G.(1991) Subcellular localisation of rat gastric phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1082: 130-135.
- Handler, J.A. (1994) Hepatobiliary function in senescent male sprague-Dawley rats. *Hepatology.* 19: 1496-1503.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends. Biochem. Sci.* 20: 73-77.
- Hasegawa-Sasaki, H., Ohno, K. (1980) Extraction and partial purification of acyl-CoA:1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyltransferase from rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 617: 205-217.
- Heckman, C.A., Friedman, J.J., Skehan, P.J., Barnett, R.J. (1977) Localization and partial characterization of acyltransferases present during rapid membrane formation in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Dev. Biol.* 55: 9-32.
- Hollenback, D., Glomset, J.A. (1998) On the relation between a steroyl-specific transacylase from bovine testis membranes and a copurifying acyltransferase. *Biochemistry* 37: 363-376.
- Holub, B.J., Mac Naughton, J.A., Piekarski, J. (1979) Synthesis of 1-palmitoyl and 1-stearoyl phosphocholines from mixtures of acyltransferases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 572: 413-422.
- Holub, B.J., Piekarski, J., Cho, C.Y., Slinger, S.J. (1976) Synthesis of 1-palmitoyl- and 1-stearoyl-PCs from mixtures of acyl acceptors via acyl-CoA:1-acyl-sn-glycero-3-PC acyltransferase in liver microsomes. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 2821-2826.
- Hradec, J., Kankova, H., Dufek, P. (1998) Alterations of phosphatidylcholine concentrations in the serum of patients with mammary cancer. *Oncol. Rep.* 5: 513-516.

- Iritani, N., Ikeda, Y., Kahitani, H. (1984) Selectivities of 1-acylglycerophosphorylcholine acyl-transferase and acyl-CoA synthetase for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 793: 416-422.
- Irvine, R.F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204: 3-16.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., May, W.S. (1998) Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272: 11671-11673.
- John, M., Schmidt, J. (1984) High-resolution hydroxyapatite chromatography of proteins. *Anal. Biochem.* 141: 466-471.
- Kamio, K., Gasa, S., Makita, A. (1992) Galactosylceramide containing omega-amino-fatty acids: preparation, characterization and sulfotransferase acceptor. *J. Lipid Res.* 33: 1227-32.
- Kasinathan, C., Grezilinska, E., Okazaki, K., Slomiany, B.L., Slomiany, A. (1990) Purification of protein fatty acyltransferase and determination of its distribution and topology. *J. Biol. Chem.* 265: 5139-5144.
- Kennedy, R. (1990) Hydrophobic Chromatography. *Methods. Enzymol.* 182:339-343.
- Kerkhoff, C., Gehring, L., Habben, K., Resch, K., Kaefer, V. (1996) Identification of two different lysophosphatidylcholine: acyl-CoA acyltransferases (LAT) in pig spleen with Putative distinct topological localisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302: 249-256.
- Kerkhoff, C., Gehring, L., Habben, K., Resch, K., Kaefer, V. (1997) The mitogen-induced lysophospholipid:acyl-CoA acyltransferase (LAT) expression in human T-lymphocytes is diminished by hydrocortisone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 632-638.
- Kerkhoff, C., Habben, K., Gehring, L., Resch, K., Kaefer, V. (1998) Substrate specificity of acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferase (LAT) from pig spleen. *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 220-226.
- Klopfenstein, D.R., Kappeler, F., Hauri, H.P. (1998) A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J.* 17: 6168-6177.
- Kramer, R.M.; Deykin, D. (1983) Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from PC to lysophosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* 263: 13806-13811.
- Krimbou, L., Tremblay, M., Davignon, J., Cohn, J.S. (1998) Association of apolipoprotein E with alpha-2-macroglobulin in human plasma. *J. Lipid Res.* 39: 2373-2386.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lands, W.E.M. (1960) Metabolism of glycerolipids, II. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J. Biol. Chem.* 235: 2233-2237

- Lands, W.E.M., Hart, P. (1965) VI. Specificities of acyl-CoA:phospholipid acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 240: 1905-1911
- Lands, W.E.M., Inoue, M., Sugiura, Y., Okuyama, H. (1982) Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 257: 14968-14972
- Lawrence, J.B., Moreau, P., Cassagne, C., Morre, D.J. (1994) Acyl transfer reactions associated with cis golgi apparatus of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 146-150.
- Lewin, T.M., Wang, P., Coleman, R.A. (1999) Analysis of amino acid motifs for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* 38: 5764-5771.
- Liu, M., Krul, E.S., Subbaiah, P.V. (1992) Effect of apolipoprotein B conformation on the activation of lysolecithin acyltransferase and lecithin: cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 15: 5139-5147.
- Liu, M., Subbaiah, P.V. (1993) Activation of plasma lysolecithin acyltransferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E. *Biochim. Biophys. Acta* 1168: 144-152.
- Lo, H.H., Teichmann, P., Furstenberger, G., Gimenez-Conti, I., Fischer S.M. (1998) Suppression of elevation of cytosolic phospholipase A₂ alters keratinocyte prostaglandin synthesis, growth and apoptosis. *Cancer Res.* 15: 4624-4631.
- MacDonald, J.I.S., Sprecher, H. (1989) Distribution of arachidonic acid in choline- and ethanolamine-containing phosphoglycerides in subfractioned human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264: 17718-17726.
- MacDonald, J.I.S., Sprecher, H. (1991) Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 105-121
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., Gooley, A.A. (1998) Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 837-844.
- Momchilova, A.B., Markovska, T.T., Koshlukova, S.E., Koumanov, K.S., Pankov, R.G. (1991) Phospholipid modifications influence acyl-CoA:1-acyl-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase in rat liver plasma membranes. *Biochem. Cell. Biol.* 69: 643-648.
- Mukherjee, A.B., Miele, L., Pattabiraman, N. (1994) Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1-10.
- Mukherjee, J.J., Tardi, P.G., Choy, P.C. (1992) Solubilization and modulation of acyl-CoA:1-acyl-glycerophosphocholine acyltransferase activity in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 27-32.

- Nakamura, K., Handa, S. (1984) Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal. Biochem.* 142: 406-10.
- Narayan, P., Dahiya R. (1991) Alterations in sphingomyelin and fatty acids in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 1099-1105.
- Needleman, P., Wyche, A., Sprecher, H., Elliot, W.J., Evers, A. (1985) A unique cytosolic acyltransferase with preferential selectivity for fatty acids that form cyclooxygenase/lipoxygenase metabolites and reverse essential fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 836: 267-273.
- Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivelin, A., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Mousalli, M.J., Hauri, H.P., Ciavarella, N., Kaufman, R.J., Ginsburg, D. (1998) Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 93: 61-70.
- Nicholson, M.L., Neoptolemos, J.P., Clayton, H.A., Talbot, I.C., Bell, P.R. (1991) Increased cell membrane arachidonic acid in experimental colorectal tumors. *Gut* 32: 413-417.
- Okuyama, H., Yamada, K., Ikezawa, H. (1975) Acceptor concentration effect in the selectivity of acyl-coenzyme A : acylglycerophosphorylcholine acyltransferase system in rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 1710-3.
- Okuyama, H., Yamada, K., Kamayana, K., Ikezawa, H., Fukushima, H., Nozawa, Y. (1977) Regulation of triacylglycerol and phospholipid synthesis in tetrahymena. *Arch. Biochem. Biophys.* 178: 319-326.
- Ondrey, F.G., Jhun, S.K., Adams, G.L. (1996) Inhibition of head and neck tumor cell growth with arachidonic acid metabolism inhibition. *Laryngoscope* 106: 129-134.
- Piomelli, D. (1993) Arachidonic acid in cell signalling. *Curr. Opinion Cell Biol.* 5: 274-280.
- Rabilloud, T. (1998) Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-760.
- Rajasekharan, R., Marians, R.C., Shockey, J.M., Kemp, J.D. (1993) Photoaffinity labeling of acyl-CoA oxidase with 12-azidooleoyl-CoA and 12-[(4-azidosalicyl)amino]dodecanoyl-CoA. *Biochemistry* 32: 12386-12391.
- Rajasekharan, R., Nachiappan, V. (1994) Use of photoreactive substrates for characterization of lysophosphatidate acyltransferases from developing soybean cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* 311: 389-394.
- Reitz, R.C., Lands, W.E., Christie, W.W., Holman, R.T. (1968) Effects of ethylenic bond position upon acyltransferase activity with isomeric cis,cis-octadecadienoyl coenzyme A thiol esters. *J. Biol. Chem.* 243: 2241-2246.
- Reitz, R.C., Thompson, J.A., Morris, H.P. (1977) Mitochondrial and microsomal phospholipids of Morris hepatoma 7777. *Cancer Res.* 37: 561-566.

- Renooij, W., Snyder, F. (1981) Transmembrane orientation of palmitoyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomes isolated from alveolar type II cell adenoma and rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 666: 468-474.
- Reynolds, J.A., Tanford, C. (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* 66: 1002-1007.
- Rogers, L., Kolattukudy, P.E. (1984) Purification of S-acyl fatty acid synthase thioester hydrolase by affinity chromatography with fatty acid synthase attached to Sepharose. *Anal. Biochem.* 137: 444-448.
- Rose, D.P., Conolly, J.M. (1993) Effects of dietary omega-3-fatty acids on human breast cancer growth and metastasis in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 85: 1743-1747.
- Ross, B.M., Moszczynska, A., Erlic, J., Kish, S.J. (1998) Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A₂ activity. *J. Neurochem.* 70: 786-793.
- Sakaguchi, M., Imray, C., Davis, A., Rowley, S., Jones, C., Lawson, N., Keighley, M.R.B., Baker, P.R., Neoptolemos, J.P. (1990) Effects of dietary N-3- and saturated fats on growth rates of the human colonic cancer cell lines SW-620 and LS 174 T in vivo in relation to tissue and plasma lipids. *Anticancer Res.* 10: 1763-1768.
- Sanford, G.L., Frosolono, M.F. (1983) The role of acyl transferase in the biosynthesis of pulmonary microsomal phosphatidylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 23-29.
- Sanjanwala, M., Sun, G.Y., Cutrera, M.A., MacQuarrie, R.A. (1988) Acylation of lysophosphatidylcholine in bovine heart muscle microsomes: purification and kinetic properties of acyl-CoA:1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 476-483.
- Sanjanwala, M., Sun, G.Y., MacQuarrie, R. (1989) Purification and kinetic properties of lysophosphatidylinositol acyltransferase from bovine heart muscle microsomes and comparison with lysophosphatidylcholine acyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 271: 407-413.
- Santini, F., Chopra, I.J., Solomon, D.H., Chua Teco, G.N. (1992) Evidence that the human placental 5-monooxidase is a phospholipid-requiring enzyme. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 74: 1366-1371.
- Sauer, L.A., Dauchy, R.T. (1990) Identification of linoleic and arachidonic acids as factors in hyperlipemic blood that increase [3H]thymidine incorporation in hepatoma 7288 CTC perfused in situ. *Cancer Res.* 48: 3106-3111.
- Sauer, L.A., Dauchy, R.T. (1993) The effect of omega-6 and omega-3 fatty acids on ³H-thymidine incorporation in hepatoma 7288CTC perfused in situ. *Brit. J. Cancer* 66: 297-303.

- Schäfer, J., Turnbull, D.M., Reichmann, H. (1993) A rapid fluorometric method for the determination of carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.* 209: 53-56.
- Schägger, H., Jagow, G. (1987) Tricine-sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schägger, H., Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- Schweizer, A., Ericsson, M., Bachi, T., Griffiths, G., Hauri, H.P. (1993) Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-golgi pathway. *J. Cell. Sci.* 104: 671-683.
- Scopes, R. (1982) Protein purification-principles and practice. *Springer-Verlag, New York*, Vol.25.
- Serhan, C.N., Haeggström, J.Z., Leslie, C.A. (1996) Lipid mediator networks in cell signalling: update and impact of cytokines. *FASEB. J.* 10: 1147-1158.
- Shimeno, H., Soeda, S., Sakamoto, M., Kouchi, T., Kowakame, T., Kihara, T. (1998) Partial purification and characterization of sphingosine-N-acyltransferase (ceramide-synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids* 33: 601-605.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175: 720-731.
- Subbaiah, P.V., Albers, J.J., Cegn, C.H., Bagdade, J.D. (1980) Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 255: 9275-9280.
- Surette, M.E., Winkler, J.D., Fonteh, A.N., Chilton, F.H. (1996) Relationships between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry* 35: 9187-9196.
- Szamel, M., Kaefer, V., Resch, K. (1987) Functional domains of the T-lymphocyte plasma membrane: characterization of the polypeptide composition. *Immunobiology* 174: 76-92.
- Tanford, C., Reynolds, J.A. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta* 457: 133-170.
- Tisdale, M.J., Beck, S. (1991) Inhibition of tumor-induced lipolysis in vitro and cachexia and tumor growth in vivo by eicosapentaenoic acid. *Biochem. Pharmacol.* 41: 103-107.
- Trotter, J., Schmidt, B., Ferber, E. (1982) Acyltransferase-catalyzed cleavage of arachidonic acid from phospholipids and transfer to lysophosphatides in lymphocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 257: 1816-1823.
- Uhing, R.J., Martenson, C.H., Rubenstein, D.S., Hollenbach, P.W., Pizzo, S.V. (1991) The exposure of murine macrophages to alpha-2-macroglobulin 'fast' forms results in the rapid secretion of eicosanoids. *Biochim. Biophys. Acta* 1093: 115-120.

- Van Heusden, G.P., Vianen, G.M., van den Bosch, H. (1980) Differentiation between acyl coenzyme A: lysophosphatidylcholine acyltransferase and lysophosphatidylcholine: lysophosphatidylcholine transacylase in the synthesis of dipalmitoylphosphatidylcholine in rat lung. *J. Biol. Chem.* 255: 9312-9318.
- Vance, D.E. (1985) Phospholipid Metabolism in Eukaryotes. *Biochemistry of lipids and membranes*, 1st ed., Vance, D.E.; Vance, J.E. Eds., Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., California, 242-270.
- Vance, D.E., Choy, P.C., Farren, S.B., Lim, P.H., Schneider, W.J. (1977) Asymmetry of phospholipid biosynthesis. *Nature* 270: 268-269.
- Vollenweider, F., Kappeler, F., Itin, C., Hauri, H.P. (1998) Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J. Cell. Biol.* 142: 377-389.
- Waku K. (1992) Origins and fates of fatty acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 101-111.
- Wehmeier, M. Großversuch Biochemie, MHH (1995) Optimierung eines Enzym-Assays zur Bestimmung der Aktivität der Lysophosphatidylcholin:Arachidonyl-CoA Acyltransferase.
- Weltzien, H.U., Richter, G., Ferber, E. (1979) Detergent properties of water-soluble choline phosphatides. *J. Biol. Chem.* 254: 3652-3657.
- Wessel, D., Flüge, U.I. (1983) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
- Wittwer, D., Wiesner, A. (1998) Insect cell stimulation by LPS requires the activity of cell-released proteases. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 39: 91-97.
- White, D.A. (1973) The phospholipid composition of mammalian tissues. In: *Form and function of phospholipids*, 1st ed., Ansell, G.B.; Hawthorne, J.N.; Dawson, R.M.C. Eds., Elsevier, Amsterdam, 441-482.
- Wise, R.W., Sun, G.Y., Macquarrie, R. (1980) The kinetic properties of oleoyl-CoA:1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase from mouse-brain microsomes. *Eur. J. Biochem.* 109: 201-206.
- Xu, Q., Shively, J. (1988) Microsequence analysis of peptides and proteins; improved electroblotting of proteins onto membranes and derivatized glass-fiber sheets. *Anal. Biochem.* 170: 19-30.
- Yamashita, S., Hosaka, K., Miki, Y., Numa, S. (1981) Glycerolipid acyltransferases from rat liver: 1-acylglycerophosphate acyltransferase, 1-acylglycerophosphorylcholine acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase. *Methods. Enzymol.* 71: 528-536.

-
- Yamashita, S., Nakaya, N., Miki, Y., Numa, S. (1975) Separation of 1-acylglycerolphosphate acyltransferase and 1-acylglycerolphosphorylcholine acyltransferase of rat liver microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 600-603.
- Yamashita, A. Sugiura, T., Waku, K. (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J. Biochem.* 122: 1-16.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 294: 1-14.
- Zahler, W.L., Barden, R.E., Cleland, W.W. (1968) Some physical properties of palmityl-coenzyme-A micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 164: 1-11.

7. Anhang

Danksagung

Der erste Dank gilt dem Leiter der Abteilung für Klinische Molekularpharmakologie, Herrn Prof. Dr. med. Klaus Resch für sein stetes Interesse an diesem Thema und dafür, daß ich diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte.

Bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Volkhard Kaefer möchte ich mich besonders bedanken, da er mit seiner hervorragenden Betreuung, steten Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie seiner allgemeinen Unterstützung einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Bei Herrn PD Dr. Walter Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referats.

Frau Dr. Martina Schnölzer vom Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg danke ich für die massenspektrometrische Proteinanalyse und Herrn PD Dr. Hubert Thole aus der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover für die Sequenzierungsarbeit, Diskussionsbereitschaft und zahlreiche nützliche Tips. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Frau Dr. Beate Kasper für Informationen zur 2D-Elektrophorese und bei Herrn PD Dr. Schrappe für die Bereitstellung der Tumorzelllinien bedanken.

Dr. Lars Gehring, Dr. Claus Kerkhoff, PD. Dr. Michael Kracht und Dr. Petra Marchand waren mir sehr wertvolle Diskussionspartner.

Ein Dank für die besonders angenehme Arbeitsatmosphäre in der Klinischen Molekularpharmakologie geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter. Gemeinschaftliche Aktivitäten, wie das Training für das alljährliche Volleyball- und Fußballturnier, sowie der regelmäßige Badminton-Abend, haben sich auch in einer sehr guten Zusammenarbeit niedergeschlagen.

Die Tätigkeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kaefer war dabei mit viel Motivation und Spaß verbunden. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Annette Garbe für ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, wie z. B. die Anleitung zur FACS-Auswertung, und bei Heike Hartmann-Ruff für die Anleitung in der Zellkultur sowie bei Christa Urban, Deniz Poyraz, Martin Leonhardt und Bernhard Vierège bedanken.

Nicht zu vergessen seien die Hebammen des Frederikenstifts, welche für den Plazenta-Nachschub gesorgt haben. Vielen Dank für die vielen Merktettel am Kühlschrank!

Meinen Eltern bin ich zu Dank verpflichtet, da sie mein Studium ermöglicht haben und mich in jeglicher Form unterstützt haben.

Am Ende möchte ich mich bei meiner Freundin Elke Gerdes ganz besonders bedanken, da sie mir in vielen Belangen eine große Hilfe war.

Publikationen

Teile dieser Arbeit konnten in verschiedenen Publikationen veröffentlicht werden:

1. Gehring, L., Haase, D., **Habben, K.**, Kerkhoff, C., Meyer, H.H., Kaever, V. (1998)
Synthesis of an unsaturated fatty acid analogue (18-(4'-azido-2'-hydroxybenzoylamino)-oleic acid) and its interaction with lysophosphatidylcholine: acyl-CoA-O-acyltransferase. *J. Lipid Res.* 39, 1118-1126.
2. Kerkhoff, C., **Habben, K.**, Gehring, L., Resch, K., Kaever, V. (1998)
Substrate specificity of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase (LAT) from pig spleen. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 220-226.
3. Kerkhoff, C., Gehring, L., **Habben, K.**, Resch, K., Kaever, V. (1997)
The mitogen-induced lysophospholipid:acyl-CoA acyltransferase (LAT) expression in human T-lymphocytes is diminished by hydrocortisone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 632-638.
4. Kerkhoff, C., Gehring, L., **Habben, K.**, Resch, K., Kaever, V. (1996)
Identification of two different lysophosphatidylcholine:acyl-CoA acyltransferases (LAT) in pig spleen with putative distinct topological localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1303, 249-256.

Lebenslauf

Kai Habben
Diplom-Biochemiker
*11.08.1969 in Wittmund

Eltern: Vater: Dieter Habben
Mutter: Heidemarie Habben, geb. Heeren

Familienstand: ledig

Schulbildung

1976-1980	Grundschule Reepsholt
1980-1982	Orientierungsstufe Friedeburg
1982-1986	Realschule „Altes Amt Friedeburg“
1986-1989	KGS-Alexander von Humboldt Schule Wittmund

Wehrdienst

06/1989-08/1990	Sanitätsdienst in Leer und der Zahnarztgruppe in Oldenburg
-----------------	--

Wissenschaftliche Ausbildung

10/1990	Studium der Chemie an der Universität Hannover
04/1992	Studienfachwechsel zur Biochemie
	Vordiplom: 02/1993
10.06.1996	Diplom im Fach Biochemie in der Abt. Klinische Molekularpharmakologie (Prof. Dr. K. Resch) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) bei Prof. Dr. V. Kaever
seit 08/1996	Dissertation an der Medizinischen Hochschule Hannover, in der Abt. Klinische Molekularpharmakologie in der Arbeitsgruppe Prof. Dr.V. Kaever

Abstract:

Lysophosphatidylcholine: acyl-CoA-O-acyltransferase (LAT, EC 2.3.1.23) plays a role in regulating the fatty acid content of membrane phospholipids and the level of unesterified arachidonic acid. LAT seems to be important in different pathological situations which are associated with abnormal cell proliferation.

The enzyme has been described as integral membrane protein, which is not sequenced and cloned, yet.

This work could give new insights into the function of LAT in tumor cells. It could be shown that the incorporation of linoleic acid into T-cell tumor cells is significantly increased in comparison to normal donor T-lymphocytes. This was observed in the case of CEM cells, the „patient celline one“ and also by direct measurement of LAT-activity.

A new concept of purifying the membrane-integrated form of LAT was found. Main steps in the purification were the membrane preparation from human placenta and the use of CHAPS and OGP as detergents for solubilization and at high concentration for destruction of LAT-protein-lipid-complexes.

Protein-analysis was partly done by conventional FPLC-chromatography. Hydrophobicity, ionexchange, gelfiltration and hydroxyapatite columns have been used.

Palmitic acid, palmitoyl-CoA and omega-aminooleic acid were used as fatty acid ligands in combination with different matrices for purification of LAT in affinity chromatography.

The LAT-protein could be solubilized by detergent treatment and was storeable over months. The solubilized protein shows a basic character being integrated in a large complex of proteins and lipids as shown by DC-analysis. The complex size is about 240kDa. High detergent concentrations, necessary for splitting the possible complex, resulted in a fast and total loss of enzyme activity indicating the importance of an essential lipid and/or protein surrounding for a functional protein conformation. A combined use of different chromatography steps in the presence of detergent was hindered by a dramatic decrease in LAT-activity.

Affinity chromatography and immunological detection led to the identification of candidate proteins of which four were selected for sequencing. Monoaminoxidase A, α -2-macroglobulin, ERGIC-53 and p63 have been found.

A possible regulatory effect of p63 and a direct involvement of α -2-macroglobulin in the deacylation/reacylation cyclus was discussed beside the activating role of apolipoproteins via α -2-macroglobulin.

keywords: acyllysophosphatidylcholine acyltransferase, FPLC-chromatography, affinity chromatography, aminooleic acid, reconstitution, membrane protein, fatty acid-remodelling

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und die zur Hilfsleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Arbeit wurde nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Außerdem erkläre ich, dass diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfarbeit verwendet wurde.

Kai Habben