

**Solubilisierung und Charakterisierung der
Sialat-4-*O*-azetyltransferase aus Golgi-Membranen der Leber
des Meerschweinchens**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

vorgelegt von

Dipl. Chem. Matthias Iwersen

Kiel

im November 2000

meiner Gesine

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	STRUKTUR UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON SIALINSÄUREN	7
1.2	VORKOMMEN VON SIALINSÄUREN.....	11
1.3	BIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON SIALINSÄUREN	12
1.3.1	Aufgrund physiko-chemischer Eigenschaften.....	12
1.3.2	Aufgrund der Strukturinformation	12
1.4	<i>O</i> -AZETYLIERTE SIALINSÄUREN.....	15
1.4.1	Vorkommen und Bedeutung der Sialat-Seitenketten- <i>O</i> -Azetylierung.....	15
1.4.2	Vorkommen und Bedeutung der Sialat-4- <i>O</i> -Azetylierung	16
1.5	SIALINSÄUREMETABOLISMUS	19
1.6	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1	MATERIAL	24
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	24
2.1.2	Chromatographische Materialien	27
2.1.3	Biologisches Material.....	28
2.1.4	Sonstige Materialien.....	28
2.1.5	Geräte und Datenverarbeitungsprogramme.....	28
2.1.6	Nomenklatur der in dieser Arbeit vorkommenden Enzyme.....	29
2.2	METHODEN.....	30
2.2.1	Allgemeine Methoden	30
2.2.1.1	Präparation freier Sialinsäuren	30
2.2.1.2	Quantifizierung von Sialinsäuren	31
2.2.1.2.1	Orcinol/Eisen(III)/Salzsäure-Assay.....	31
2.2.1.2.2	Quantifizierung über HPLC	32
2.2.1.3	Primulin-Färbung	32
2.2.1.4	Proteinquantifizierung	33
2.2.1.6	Elektronenmikroskopie von Leberschnitten und Golgi-Membranpräparationen.....	33
2.2.1.7	Gangliosidextraktion	34
2.2.1.7.1	In Anlehnung an die Methode nach Folch modifiziert nach Ledeen und Yu	34
2.2.1.7.2	Nach der Methode von Ladisch <i>et al.</i> modifiziert nach Senn <i>et al.</i>	34
2.2.1.8	Säurehydrolyse freier und gebundener Neu4,5Ac ₂ sowie freier Neu5,9Ac ₂	35
2.2.1.8.1	Freie Neu4,5Ac ₂ und Neu5,9Ac ₂	35
2.2.1.8.2	Neu4Ac5Gc-GM3	35
2.2.1.8.3	Meerschweinchenserum	35
2.2.1.8.3.1	Ohne Detergenz	35
2.2.1.8.3.2	Mit Detergenz	35
2.2.1.9	Präparation von Asialofetuin.....	35
2.2.1.10	Präparation des GD3-Tetrasaccharids	36
2.2.1.10.1	Ozonolyse	36
2.2.1.10.2	β-Eliminierung	36
2.2.1.10.3	Größenausschlußchromatographie	36
2.2.1.11	Präparation intakter Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen	37
2.2.1.12	Präparation von Meerschweinchenserum.....	38
2.2.1.13	Erythrozytenpräparation	39
2.2.1.13.1	Native Erythrozyten.....	39

2.2.1.13.2	Erythrozytenmembranen (Ghosts).....	39
2.2.1.13.3	Fixierte Erythrozytenmembranen.....	39
2.2.1.14	Alkalische Verseifung.....	40
2.2.1.15	Sialat- <i>O</i> -Azetylerasetests.....	40
2.2.1.15.1	Unspezifisch mit 4-Methylumbelliferylacetat.....	40
2.2.1.15.2	Spezifisch mit Neu4,5Ac ₂	40
2.2.2	Chromatographien.....	41
2.2.2.1	Dünnschichtchromatographie.....	41
2.2.2.1.1	Auf Zellulose.....	41
2.2.2.1.2	Auf Kieselgel 60.....	41
2.2.2.1.2.1	Ganglioside.....	41
2.2.2.1.2.2	Sialosaccharide.....	41
2.2.2.1.2.3	Oligosaccharide.....	42
2.2.2.2	Normaldruck Säulenchromatographie.....	42
2.2.2.2.1	Für die Präparation freier Sialinsäuren.....	42
2.2.2.2.2	DEAE-Ionenaustauschchromatographie.....	42
2.2.2.2.3	Sepak TM -RP-18-Chromatographie.....	43
2.2.2.2.4	Iatrobeads Kieselgelchromatographie.....	43
2.2.2.3	HPLC.....	44
2.2.2.3.1	Sialinsäureanalytik.....	44
2.2.2.3.2	Gruppentrennung von Gangliosiden.....	44
2.2.3	Sialat-4- <i>O</i> -Azetyltransferasetestsysteme.....	45
2.2.3.1	Erster Enzymtest.....	45
2.2.3.2	Zweiter Enzymtest.....	46
2.2.3.3	Dritter Enzymtest — Erste Variante.....	47
2.2.3.4	Dritter Enzymtest — Zweite Variante.....	48
2.2.3.5	Vierter Enzymtest.....	49
2.2.3.6	Fünfter Enzymtest.....	50
2.2.4	Methoden zur Produktcharakterisierung.....	51
2.2.4.1	Alkalische De- <i>O</i> -azetylierung.....	51
2.2.4.2	Laktosylceramid als exogener Akzeptor.....	51
2.2.4.3	Inaktivierung des Enzyms durch Hitzedenaturierung.....	51
2.2.4.4	Propionsäurehydrolyse des enzymatisch <i>O</i> -azetylierten GD3.....	51
2.2.4.5	Behandlung des <i>O</i> -azetylierten GD3 durch verschiedene Sialidasen.....	51
2.2.4.6	Co-Chromatographie von durch NDVS behandeltes enzymatisch <i>O</i> -azetyliertes GD3 mit Neu4,5Ac ₂	52
2.2.4.7	Neu4,5Ac ₂ als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT.....	52
2.2.4.8	Neu5,9Ac ₂ als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT.....	52
2.2.4.9	Neu5Gc-GM3 als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT.....	52
2.2.4.10	Neu4Ac5Gc-GM3 als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT.....	53
2.2.4.11	Co-Chromatographie von enzymatisch <i>O</i> -azetyliertem GD3 mit Neu5,9Ac ₂ -GD3.....	53
2.2.4.12	Präparation von enzymatisch <i>O</i> -azetyliertem GD3.....	53
2.2.4.13	Inkubation und anschließende Analyse von Golgi-Membranen mit nicht radioaktivem AcCoA in An- oder Abwesenheit von GD3.....	54
2.2.4.14	Inkubation und anschließende Analyse von Solubilisat mit GD3 und nicht radioaktivem AcCoA.....	54
2.2.4.15	Unterschiedliche Puffer für die 4-OAT-Reaktion.....	55
2.2.5	Methoden zur Enzymcharakterisierung.....	55
2.2.5.1	Solubilisierung von Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen.....	55
2.2.5.2	Sialyltransferasetest.....	55
2.2.5.3	Bestimmung der optimalen CHAPS-Konzentration.....	56

2.2.5.3.1	Für endogenes Substrat.....	56
2.2.5.3.2	Für exogenes Neu5Ac	56
2.2.5.3.3	Für exogenes GD3	56
2.2.5.4	Zeitabhängigkeit der 4-OAT-Reaktion.....	57
2.2.5.4.1	Mit endogenem Substrat.....	57
2.2.5.4.2	Mit Neu5Ac als Substrat	57
2.2.5.4.3	Mit GD3 als Substrat	57
2.2.5.5	Temperaturabhängigkeit der solubilisierten 4-OAT	57
2.2.5.6	pH-Optimum der solubilisierten 4-OAT	57
2.2.5.7	Abhängigkeit der solubilisierten 4-OAT von der Pufferkonzentration	57
2.2.5.8	Kaliumchloridoptimum der solubilisierten 4-OAT	58
2.2.5.9	Reversible Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch hohe Kaliumchlorid- konzentration	58
2.2.5.10	Proteinabhängigkeit der solubilisierten 4-OAT.....	58
2.2.5.10.1	Das membrangebundene System.....	58
2.2.5.10.2	Die solubilierte 4-OAT	59
2.2.5.11	Nachinkubation mit AcCoA	59
2.2.5.12	Kinetische Aspekte	59
2.2.5.12.1	Michaelis-Menten-Kinetik für die Substrate AcCoA, GM3, GD3, GD1a und GD1b	59
2.2.5.12.2	Bestimmung der Inhibitionskonstante für CoA.....	60
2.2.5.13	Weitere Inhibitionsversuche	60
2.2.5.13.1	Inhibitionsversuch mit 3'-Dephospho-CoA	60
2.2.5.13.2	Inhibitionsversuch mit Desulfo-CoA	60
2.2.5.13.3	Inhibitionsversuch mit DIDS.....	61
2.2.5.13.4	Inhibitionsversuche mit verschiedenen Nukleotiden und anderen Verbindungen	61
2.2.5.13.5	Inhibitionsversuch mit Laktosylceramid	61
2.2.5.13.6	Inhibitionsversuch mit Cibacron-Blue F3G-A	61
2.2.5.14	Stabilitätstests	61
2.2.5.14.1	Stabilitätstest des membrangebundenen Enzyms bei drei Temperaturen	61
2.2.5.14.2	Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms bei 4 °C.....	62
2.2.5.14.3	Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms gegenüber Frier-Tau-Zyklen	62
2.2.5.14.4	Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms gegenüber Lyophilisation.....	63
2.2.5.14.5	Einfluß anderer Substanzen auf die 4-OAT-Aktivität.....	63
2.2.5.15	Ultrafiltrierfähigkeit der solubilisierten 4-OAT	63
2.2.5.16	Co-Faktor-Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion	63
2.2.5.17	Test auf Anwesenheit des Co-Faktors in Meerschweinchenleberhomogenats- überstand und -serum.....	65
2.2.5.18	Lipide, Neutralsaccharide, Metallionen und andere Substanzen als potentielle Co-Faktoren	65
2.2.5.19	Versuche der Enzymreinigung	66
2.2.5.19.1	Cibacron Blue F3G-A-Chromatographie	66
2.2.5.19.2	Kationenaustauschchromatographie mit S-Sepharose	66
2.2.5.19.3	CoA-Agarose-Chromatographie.....	67
2.2.5.20	Proteinanalysen durch Natriumdodekylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.2.5.20.1	Siberfärbung von Polyakrylamidgelen	69
3	VERSUCHSERGEBNISSE.....	71
3.1	ISOLIERUNG INTAKTER MEERSCHWEINCHENLEBER GOLGI-MEMBRANEN	71

3.2	SOLUBILISIERUNG DER 4-OAT	74
3.2.1	Wahl des geeigneten Detergenzes	74
3.2.2	Ermittlung der optimalen Detergenzkonzentration für die Solubilisierung der 4-OAT in Gegenwart endogenen Akzeptors	76
3.2.3	Sialinsäureanalyse der im Enzymtest gefällten, radioaktiv markierten Proteine	77
3.3	SUCHE NACH GEEIGNETEN EXOGENEN AKZEPTOREN FÜR DIE SOLUBILISIERTE 4-OAT	77
3.3.1	Freie Sialinsäuren als exogene Akzeptoren.....	78
3.3.2	Oligosaccharide als exogene Akzeptoren.....	79
3.3.3	CMP-Neu5Ac als exogener Akzeptor.....	80
3.3.4	Proteine als exogene Akzeptoren	80
3.3.5	Ganglioside als exogene Akzeptoren	81
3.4	4-O-AZETYLIERUNG EXOGENER SUBSTRATE DURCH DIE MEMBRAN- GEBUNDENE 4-OAT	84
3.5	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMPRODUKTE	85
3.5.1	Alkalische De-O-azetylierungen	85
3.5.2	Laktosylceramid als exogener Akzeptor	86
3.5.3	Inaktivierung des Enzyms durch Hitze	86
3.5.4	Propionsäurehydrolyse des enzymatisch O-azetylierten GD3	87
3.5.5	Sialidasebehandlung des enzymatisch O-azetylierten GD3	88
3.5.6	Neu4,5Ac ₂ , Neu5,9Ac ₂ und Neu5,9Ac ₂ -GD3 als exogene Akzeptoren	91
3.5.7	Neu5Ac-GM3 und Neu4Ac5Gc-/Neu5Gc-GM3 als exogene Akzeptoren	92
3.5.8	Präparation von enzymatisch O-azetyliertem GD3.....	93
3.5.9	Inkubation von GD3 mit der solubilisierten 4-OAT und nicht radioaktivem AcCoA mit anschließender Analyse	94
3.6	CHARAKTERISIERUNG DER 4-OAT-REAKTION	95
3.6.1	Bestimmung der optimalen Detergenzkonzentration mit exogenen Akzeptoren.....	95
3.6.2	Zeitabhängigkeit der 4-OAT-Reaktion für Neu5Ac und GD3.....	96
3.6.3	Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Temperatur	97
3.6.4	Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion vom pH-Wert	98
3.6.5	Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Pufferkonzentration.....	99
3.6.6	Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Kaliumchloridkonzentration	100
3.6.7	Reversible Inhibition der 4-OAT-Reaktion durch hohe Kaliumchlorid- konzentrationen	101
3.6.8	Abhängigkeit der solubilisierten und membrangebundenen 4-OAT-Reaktion vom Proteingehalt.....	102
3.6.9	Experiment zur Nachinkubation mit AcCoA	103
3.6.10	Kinetische Aspekte.....	103
3.6.10.1	Michaelis-Menten-Kinetik für die Substrate AcCoA, GM3, GD3, GD1a und GD1b	103
3.6.10.2	Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten für CoA	106
3.6.11	Weitere Inhibitionsversuche.....	107
3.6.11.1	Inhibitionsversuche mit Desulfo-CoA und 3'-Dephospho-CoA.....	107
3.6.11.2	Inhibition durch verschiedene Nukleotide und andere Verbindungen	113
3.6.11.3	Mit 4,4'-Dithioisocyno-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS).....	115
3.6.11.4	Mit Laktosylceramid	116
3.6.12	Stabilitätstests.....	116
3.6.12.1	Stabilität des membrangebundenen Enzyms bei drei Temperaturen.....	116
3.6.12.2	Stabilität des solubilisierten Enzyms bei 4 °C.....	117

3.6.12.3	Stabilität des solubilisierten Enzyms gegenüber Frier-Tau-Zyklen	117
3.6.12.4	Des solubilisierten Enzyms gegenüber Lyophilisation	118
3.6.12.5	Einfluß anderer Substanzen auf die 4-OAT-Aktivität.....	118
3.6.13	Ultrafiltrierbarkeit der solubilisierten 4-OAT	119
3.6.14	Testen verschiedener Substanzen als potentielle Co-Faktoren	120
3.6.15	Co-Faktorabhängigkeit der solubilisierten 4-OAT.....	121
3.7	WEITERE UNTERSUCHUNGEN	121
3.7.1	Präparation des GD3-Tetrasaccharids Neu5Ac(α 2,8)Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc	121
3.7.2	Hydrolyseversuche	122
3.7.3	Sialinsäurescreening von Meerschweinchenserum, -colon, -milz und -niere	125
3.7.3.1	Serum-Neu4,5Ac ₂ als 4-OAT-Marker.....	127
3.7.4	Gangliosidisolationen.....	128
3.8	ENZYMREINIGUNGSANSÄTZE.....	132
3.8.1	Chromatographien.....	132
3.8.1.1	Cibacron Blue F3G-A-Agarosechromatographie.....	132
3.8.1.2	Kationenaustausch an S-Sepharose	133
3.8.1.3	Affinitätschromatographie an Co-Agarose.....	135
4	DISKUSSION.....	139
4.1	ENTWICKLUNG VON 4-OAT-TESTSYSTEMEN	139
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMPRODUKTE	140
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER 4-OAT-REAKTION	142
4.4	REINIGUNGSANSÄTZE FÜR DIE 4-OAT	146
4.5	WEITERE UNTERSUCHUNGEN	147
4.5.1	Betrachtungen zur Säurehydrolyse von <i>O</i> -azetylierten Sialinsäuren	147
4.5.2	Extraktion von Gangliosiden aus Meerschweinchenserum, -leber und -hirn.....	148
4.5.3	Sialinsäuremuster verschiedener Gewebe und Korrelation des Serum- Neu4,5Ac ₂ -Gehalts mit der 4-OAT-Aktivität in Golgi-Membranensolubilisat	149
5	ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG UND AUSBLICK.....	151
6	LITERATUR	156
7	DANKSAGUNG	168

1 Einleitung

Kohlenhydrate nehmen unter den auf der Erde vorhandenen Naturstoffen — bezogen auf die Masse mit schätzungsweise 200 Milliarden Tonnen jährlicher Synthese — den ersten Platz ein. Allen Kohlenhydraten ist die im Vergleich zu ihrer Molekülgröße auftretende Häufung funktioneller Gruppen gemein, insbesondere der Hydroxylgruppen, wodurch sie sich von den drei anderen Biomolekülhauptklassen, den Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren unterscheiden.

Der überwiegende Anteil der in der Natur vorkommenden Kohlenhydrate wird über den photosynthetischen Prozess aus Kohlenstoffdioxid und Wasser von grünen Pflanzen assimiliert. Entsprechend der großen molekularen Variabilität ist die Funktion dieser Substanzklasse sehr breitgefächert. Drei Aspekte werden in biologischen Systemen durch Kohlenhydrate abgedeckt:

- a) Der *energetische Aspekt* — Kohlenhydrate dienen neben Fetten als Hauptenergiespeicher für Organismen. Schon zum Ende des 19. Jahrhunderts wurde mit Eduard Buchners Entdeckung der "zellfreien Gärung" der Grundstein der Aufklärung des wohl mit am besten untersuchten Abbauprozesses gelegt — der Glykolyse und dem sich weiter anschließenden anaeroben Abbau bei der Gärung oder dem aeroben Abbau durch den Zitratzyklus und die Atmungskette. Gleichzeitig fand die moderne Biochemie ihren Ursprung. Neben der direkten Umwandlung von Glukose in Energie durch Gärung und oxidative Phosphorylierung, kann Glukose als verzweigtes Homopolymer (ein Glucan) auch in Form von Glykogen (in Tieren und Pilzen) oder Stärke (in Pflanzen) gespeichert werden.
- b) Das im Hinblick auf den *strukturellen Aspekt* bekannteste Kohlenhydrat ist das Glukan Zellulose, welches Stützfunktion und Formgebung in der Pflanzenzellwand leistet. Doch auch in der Zellwand/Zellmembran von Mikroorganismen und Tieren erfüllen Kohlenhydrate strukturelle Aufgaben. Die Ausbildung des Ribose- bzw. 2'-Desoxyribosephosphatgrundgerüsts in der RNA bzw. DNA gehört ebenfalls in die Kategorie Strukturbildung. Kohlenhydrate geben auch durch kovalente Bindung an Lipide und Proteine ihren Trägermolekülen eine charakteristische Struktur, die, insofern solche Glykokonjugate Bestandteil von Membranen sind, zu deren Beschaffenheit beitragen oder die Eigenschaft von Makromolekülen grundlegend beeinflussen. Ein bekanntes Beispiel stellt das Chitin im Panzer von Insekten und im Außenskelett von Arthropoden (Krustentieren) dar, in dem ein Derivat der Glukose, das *N*-Azetylglukosamin, in kovalenter Bindung an ein Protein die Charakteristik des Chitins gewährleistet. Proteoglykane (Glykoproteine mit Aminosucker- und Uronsäure-enthaltenden Glykanen) sind auch am Aufbau von z.B. Haut,

Knorpel und Blutgefäßen beteiligt. Auch die Struktur von Gelen und Muzinen (Schleimen) ist auf die Anwesenheit von Kohlenhydraten zurückzuführen.

- c) Der *regulative (und jüngste) Aspekt* von Kohlenhydraten ist in allen biologischen Systemen von höchster Bedeutung und bietet ein weites Forschungsfeld, das in seiner Mannigfaltigkeit kaum zu übertreffen ist. So hat man zum Beispiel erkannt, daß
- ⇒ bestimmte Kohlenhydratstrukturen die Lebenszeit von Zellen und Proteinen mitbestimmen,
 - ⇒ Zelladhäsionsprozesse durch das Fehlen oder die Anwesenheit oder auch die Modifikation bestimmter Zucker eingeleitet bzw. unterbunden werden,
 - ⇒ Befruchtungsvorgänge erkannt werden,
 - ⇒ der Befall durch Bakterien und Viren verhindert, aber auch eingeleitet werden kann.

Somit hat die Kohlenhydratforschung in vielerlei Hinsicht in Gebiete Einzug gehalten, die dieser Substanzklasse ursprünglich vorenthalten waren und sie als ein besonders wichtiges Gebiet in der zukünftigen Biowissenschaft ausweisen.

1.1 Struktur und physikalische Eigenschaften von Sialinsäuren

Auch die *Sialinsäureforschung* als spezieller Teil der Kohlenhydratforschung befaßt sich mit zumeist regulativen Aspekten. *Sialinsäuren* (Sia) gehören zu der Gruppe multifunktionaler Ketosen, die neben der Carbonyl- und den vier Hydroxygruppen noch eine Azetamido- und eine Carboxylatfunktion im neun Kohlenstoffatome umfassenden Grundgerüst enthalten. Die beiden grundsätzlichen Vertreter dieser Saccharidfamilie, von denen sich fast sämtliche der über 40 natürlich vorkommenden Derivate ableiten lassen, sind die *N*-Azetylneuraminsäure (5-Azetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galakto-2-nonulosonsäure; Neu5Ac) und das an der 5-*N*-Azetylgruppe hydroxylierte Derivat, die *N*-Glykolylnneuraminsäure (5-Hydroxyacetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galakto-2-nonulosonsäure; Neu5Gc). Alleine die Substitution der Hydroxylfunktionen durch Laktyl-, Methyl-, Phosphat-, Sulfat-, vor allen Dingen aber durch Azetylgruppen läßt eine enorme Variationsbreite entstehen, die durch das Vorkommen von Anhydro- und Dehydroverbindungen, sowie durch intermolekulare Laktonbildung noch weiter ergänzt wird (TEKIEVA und DIATLOVITSKAIA, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1998; TERABAYASHI und KAWANISHI, 1998) (Abbildung 1).

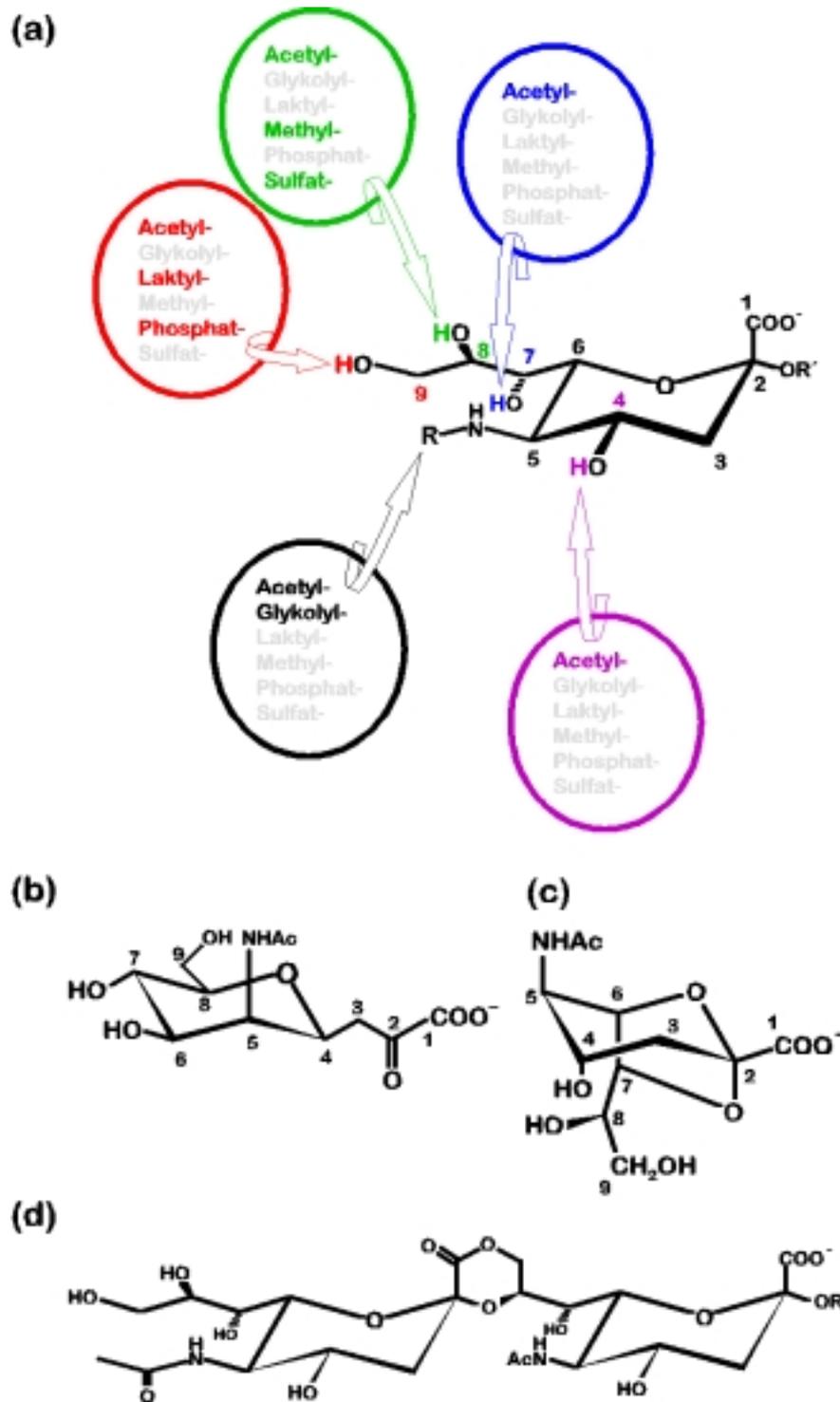


Abbildung 1: Häufig vorkommende natürliche Derivate der Neuraminsäure.

- (a) Substitutionsmöglichkeiten durch Azetyl-, Glykolyl-, Laktyl-, Methyl-, Phosphat- und Sulfatgruppen (Mögliche Substituenten sind farbig hervorgehoben).
- (b) Molekülstruktur von 4,8-Anhydro-Neu5Ac.
- (c) Molekülstruktur von 2,7-Anhydro-Neu5Ac.
- (d) Beispiel einer Laktonbildung anhand des intermolekularen 2,8'-Laktons einer terminalen Disialoeinheit.

Der in den frühen 1950er Jahren eingeführte Name *Sialinsäure* leitet sich vom griechischen Wort "sialos" für Speichel ab und verweist auf den hohen Gehalt von Sia im Muzin des Speichels. Auch der Name *Neuraminsäure* (1941 erstmals durch Klenk eingeführt und erst 1957 durch Blix, Gottschalk und Klenk übergreifend geprägt) legt den Ursprung der Namensgebung im Nervengewebe, insbesondere im Gehirn nahe, aus dem Mitte der 1930er Jahre eine sialinsäurehaltige Glykolipidfraktion isoliert worden war, deren Bestandteile 1941 schließlich als Ganglioside bezeichnet wurden (FAILLARD, 1989).

Heute neigt man dazu, die 3-Desoxy-D-glycero-D-galakto-non-2-ulosonsäure (Kdn), die anstelle der Azetamidogruppe durch eine Hydroxylfunktion an C-5 substituiert ist, auch zu der Familie der Sia zu zählen, da die Biochemie in beiden Fällen sehr ähnlich und die Konformation die gleiche ist (NADANO *et al.*, 1986; KANAMORI *et al.*, 1990; KITAZUME *et al.*, 1992; SONG *et al.*, 1991, SONG *et al.*, 1993). Die allgemeinste Sia-Formel in verschiedenen Projektionen ist in Abbildung 3 zu sehen.

N-Azetylneuraminsäure liegt natürlicherweise in der 2C_5 -Konformation vor und bildet dabei in Lösung zu mehr als 93 % das β -Anomer, in kristallinem Zustand ist dies ausschließlich der Fall. Glykosidische Neu5Ac-Bindungen werden mit der einzigen Ausnahme des Neu5Ac-Donors CMP-Neu5Ac, welcher Neu5Ac β -glykosidisch gebunden enthält, nur α -glykosidisch ausgebildet. Durch die Carboxylfunktion mit einem pK_a von etwa 2.6 sind Sia starke Säuren und üben damit einen starken Einfluß auf ihre molekulare Umgebung aus, was unter anderem zur Autohydrolyse der eigenen glykosidischen Bindung führen kann. Die Glycerolseitenkette nimmt in der 2C_5 -Konformation eine äquatoriale Position ein und ist aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen eher fixiert als frei beweglich, weshalb die Hydroxylgruppen an C-7 und C-8 transständig vorliegen. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind dabei einerseits zwischen dem Sauerstoffatom an C-7 und dem Wasserstoffatom der Azetamidbindung an C-5 und andererseits ausgehend vom Ringsauerstoffatom hin zum Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe an C-8 ausgebildet (Abbildung 3).

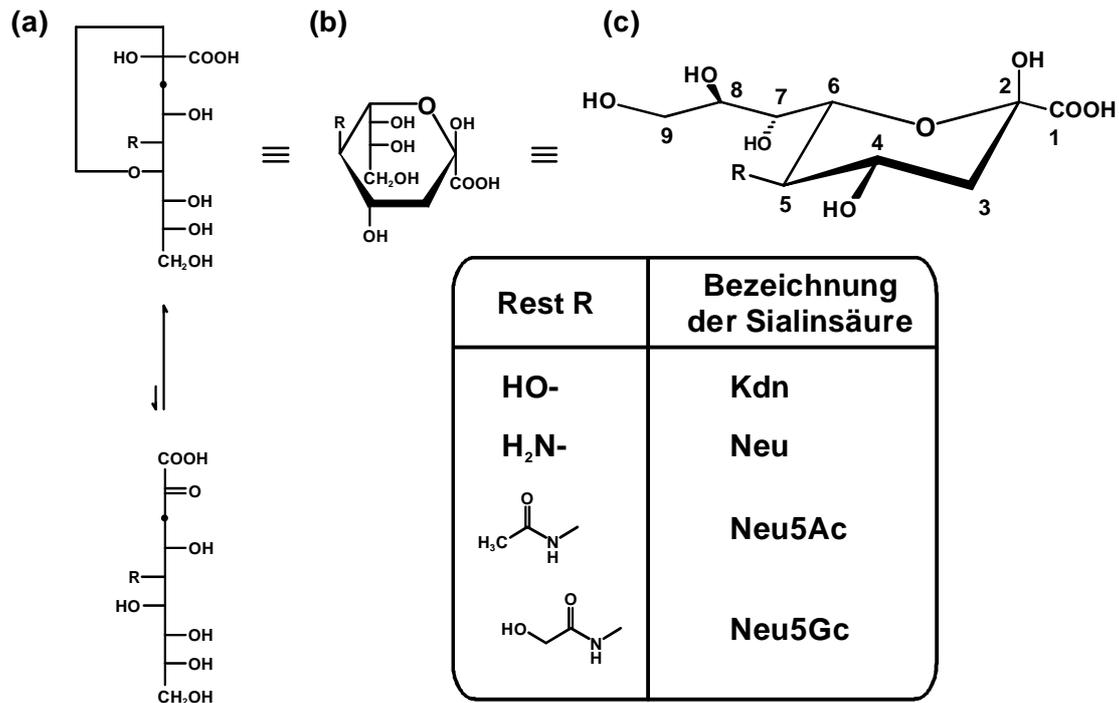


Abbildung 2: Projektionen der vier natürlichen 5-substituierten (β)-D-Neuraminsäuren.

(a) Fischer-Projektion.

(b) Haworth-Projektion.

(c) Reeves-Projektion (²C₅-Sessel-Konformation).

In der integrierten Tabelle sind die entsprechenden Derivate in ihrer abgekürzten Form benannt.

Die Vielseitigkeit der Sia setzt sich in ihrem glykosidischen Bindungsverhalten fort und erweitert somit nochmals das Spektrum des strukturellen Informationsgehalts beträchtlich. Wie schon zuvor angegeben, bilden Sia (einzige Ausnahme in CMP-Sia) immer α₂-glykosidische Bindungen aus. Bei N-Glykanen handelt es sich dabei meistens um α_{2,3}-/ α_{2,6}-Bindungen zu Galaktose oder N-Azetylgalaktosamin, um α_{2,6}-Bindungen zu N-Azetylglucosamin oder α_{2,8}-Bindungen zu anderen Sia (VLIEGENTHART *et al.*, 1983; SATO *et al.*, 1998). In O-Glykanen wird das jeweilige core-Oligosaccharid jeweils um eine Sialinsäureeinheit erweitert (SCHACHTER, 1992). Neben diesen allgemeinen, häufig auftretenden Bindungstypen gibt es eine ganze Reihe anderer, wie Neu5Ac(α_{2,4})Gal (TAKASAKI *et al.*, 1979), Neu5Ac(α_{2,4})GlcNAc (SLOMIANY und SLOMIANY, 1978), Neu5Ac(α_{2,9})Neu5Ac (FUKUDA *et al.*, 1985), Neu5Gc(α_{2,8})Neu5Gc (ROY und PON, 1990) oder Neu5Gc(α_{2,O-5})Neu5Gc (KITAZUME *et al.*, 1994).

Meistens finden sich Sia als Bestandteil komplexer Glykokonjugate terminal und damit am nicht reduzierenden Ende der Glykane gebunden, doch das muß nicht immer so sein; in einigen

bakteriellen Lipopolysaccharidstrukturen z.B. sind Sia in die Oligosaccharidkette integriert (z.B. (WESSELS *et al.*, 1991; KOGAN *et al.*, 1995; GAMIAN *et al.*, 1994).

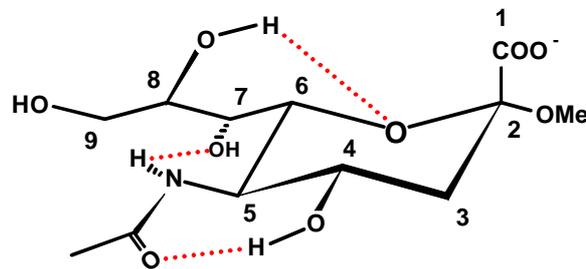


Abbildung 3: Wasserstoffbrücken im Neu5Ac- α -D-Methylglykosid
(Nach Czarniecki und Thornton, 1976 in SCHAUER, 1982)

Die Wasserstoffbrücken sind durch rot gepunktete Linien dargestellt. Durch diese Bindungen wird die Flexibilität der Glycerolseitenkette sehr stark eingeschränkt. Die vicinalen Hydroxylgruppen an C-7 und C-8 sind somit transständig. Dies wirkt sich beispielsweise erschwerend bei der Periodsäureoxidation aus, falls die Hydroxylgruppe an C-9 azetyliert ist.

1.2 Vorkommen von Sialinsäuren

Das Vorkommen der Sia beschränkt sich auf das Tierreich und einige Mikroorganismen. Das Pflanzenreich ist bisher als "sialinsäurefrei" zu bezeichnen. Innerhalb des Tierreichs ist eine weitere Gliederung vorzunehmen, da evolutionär im Zweig der Deuterostomia (Zweimünder) erst ab den Hemichordata (Halb-Rüchsaientieren) Sia nachzuweisen sind. So gilt es als gesichert, daß der Tierstamm der Echinodermata (Stachelhäuter) und der Vertebrata (Wirbeltiere) durchgehend Sia exprimiert. Bisher wurde angenommen, Echinodermata seien evolutionär die ersten Tiere mit Sialinsäurestoffwechsel und galten daher als "Erfinder der Sialinsäuren". Neuere Untersuchungen verweisen allerdings auf Sialinsäurevorkommen in Insekten (ROTH *et al.*, 1992; KARAFALI *et al.*, 1997; KARAFALI *et al.*, 1999), die dem Stammbaumzweig der Protostomia (Urmundtiere) zugehörig sind. Da die Expression von Sia in diesen Insekten allerdings nur in bestimmten Entwicklungsabschnitten des Larvenstadiums anzutreffen ist, ist es leicht möglich, daß ihr Vorkommen bei den bisherigen Analysen übersehen wurde.

Auch einige Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Protozoen, von denen viele pathogen sind, haben glykosidisch gebundene Sia zu bieten. Neben einigen Bakterien, die über einfache Stoffwechselprozesse Neu5Ac selbständig synthetisieren können (VANN *et al.*, 1997), entwickelte die Mehrzahl der Mikroorganismen Wege, sich Wirtssialinsäuren zunutze zu machen. Ein aktuelles Beispiel ist der Protozoe *Trypanosoma brucei*, welcher durch eine für einige Trypanosomen einzigartige Transsialidasereaktion Wirtssialinsäuren auf eigene Glykoproteine zu übertragen vermag (ENGSTLER *et al.*, 1997). Die Bedeutung der Sialylierung solcher oftmals

pathogenen Mikroorganismen liegt im Entkommen der körpereigenen Abwehr des Wirts durch "Tarnung" mittels wirtseigener Strukturen oder aber im Zugang zum Wirt durch sialinsäure-spezifische Erkennungsprozesse.

1.3 Biologische Bedeutung von Sialinsäuren

1.3.1 Aufgrund physiko-chemischer Eigenschaften

Wie einleitend berichtet, zeichnen sich Sia durch eine hohe Strukturvielfalt sowohl des Monomers als auch der Oligomere aus. Dies und die Tatsache, daß Sia in Glykanen fast ausschließlich terminal lokalisiert und zelluläre Glykanstrukturen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran in der sogenannten Glykocalyx zu finden sind, gibt den Ausschlag für die Relevanz der Sia als Strukturbildner und Informationsspeicher.

Die saure Eigenschaft von Sia ($pK_a \approx 2.6$) ist verknüpft mit der Fähigkeit, Kationen aller Art zu binden und damit auch zu transportieren. Dies bietet die Möglichkeit, den Transport pharmakologisch wirksamer Substanzen in die Zelle zu erleichtern. Das kationische Bindungsvermögen ist außerdem wichtig für die rheologischen Eigenschaften der zumeist hochsialylierten Muzine. Doch auch die unter physiologischen Bedingungen negative Ladung selbst ist der Grund für den antiadhäsiven Effekt von beispielsweise Erythrozyten untereinander (die ansonsten aggregieren) (SCHAUER, 1982) oder die räumliche Anordnung der Glykanketten von Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche und glykosylierten Proteinen (VARKI, 1993). Tatsächlich können Proteine dadurch auch teilweise vor proteolytischem Verdau bewahrt werden (FAILLARD und SCHAUER, 1972), und es kann sich die Thermostabilität und Löslichkeit von Glykokonjugaten in Körperflüssigkeiten erhöhen (VARKI, 1993). In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß auch anderen Kohlenhydraten diese Eigenschaft zufallen kann, sofern sie sulfatiert oder carboxyliert sind.

1.3.2 Aufgrund der Strukturinformation

Erstrangig ist der außergewöhnlich hohe Informationsgehalt sialinsäuretragender Glykane und Glykokonjugate. Hierbei erfüllen Sia zwei allgemeingültige Eigenschaften: Sie dienen selbst als Epitope bei der Ligandenerkennung durch Rezeptoren, und sie können auch die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung durch Maskierung der subterminalen Strukturen stören.

Die für Menschen wichtigste Gruppe sialinsäureerkennender Rezeptoren stellen die Selektine dar, eine Familie der Zelladhäsionsmoleküle. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Leukozytenrekrutierung in Entzündungsprozessen oder Immunreaktionen und bestehen aus drei Mitgliedern, den L-, E- und P-Selektinen, jeweils benannt nach ihrem Vorkommen auf Lympho-

zyten/Leukozyten, Endothel- und Platelet (Blutplättchen)-Zellen. Neben Gemeinsamkeiten in der Struktur haben diese Transmembranproteine auch gemeinsame Funktionen. Es ist ihre Aufgabe, vor der Infiltration der Leukozyten aus dem Blutgefäß in das umliegende Gewebe, diese aus dem Blutstrom zum Abbremsen und zum ersten adhäsiven Kontakt mit den Endothelzellen zu bringen (Leukozyten-Rollen), bis hochaffine, irreversible Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Leukozyten-gebundenen Integrinen und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) eine feste Bindung forcieren (LASKY, 1995). Während L-Selektin auf spezialisierten Leukozyten exprimiert ist, werden P- und E-Selektin auf der extrazellulären, der Gefäßinnenwand zugewandten Seite der Endothelzellen freigesetzt, bzw. *de novo* exprimiert.

Auch beim "homing" der Lymphozyten zu den Lymphknoten spielen sich ähnliche Prozesse ab. Die entscheidenden Epitope, welche durch die Selektine erkannt werden, leiten sich allesamt vom Sialyl-Lewis^x- oder dem dazu isomeren Sialyl-Lewis^a-Tetrasaccharid ab.

Das Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid spielt darüber hinaus auch bei einigen malignen Ereignissen und Metastasierungen eine Rolle, außerdem wird diesem bei der Abstoßung transplantierten Gewebes Bedeutung zugemessen (RÜCK-BRAUN, 1998).

Es gibt aber auch andere sialinsäureabhängige Adhäsionsmoleküle, wie die der Immunoglobulin-Superfamilie zugehörigen Siglecs (Sialinsäure-bindende Immunoglobulin-ähnliche Lektine), die im Gegensatz zu den Selektinen eine hohe strukturelle Spezifität und Affinität gegenüber verschiedenen sialylierten Glykanepitopen besitzen (KELM *et al.*, 1994a; KELM *et al.*, 1996; POWELL *et al.*, 1993; SJOBERG *et al.*, 1994). Das zuerst entdeckte Siglec Sialoadhäsion (Sn) vermittelt die Wechselwirkung spezifischer Makrophagen mit myeloiden Zellen. Interessanterweise ist das Protein selbst sialyliert, wobei der Sialylierungsgrad die Effektivität der Zelladhäsion beeinflusst (BARNES *et al.*, 1999). Andere Vertreter dieser Gruppe sind das sehr gut untersuchte B-Zellen-Adhäsionsmolekül CD22 und der kleinste Vertreter, das CD33, welches als wichtiger Marker in der Diagnose der akuten myeloiden Leukämie dient (KELM *et al.*, 1998), sowie das Myelin-assoziierte Glykoprotein MAG. Letzteres kommt ausnahmslos auf Oligodendrozyten und Schwann'schen Zellen vor und beeinflusst höchstwahrscheinlich sowohl die Myelinierung, die axonale Wachstumsregulation, als auch die Signalübertragung (STRENGE *et al.*, 1998).

Zahlreiche pathogene und nicht-pathogene Mikroorganismen machen sich Kohlenhydratstrukturen auf Zelloberflächen ihres Wirts zunutze, um daran zu binden und anschließend einzudringen. Darunter sind viele Mikroorganismen für ihre Sialinsäure-spezifische Erkennung bekannt. Konkrete Beispiele sind Myxoviren, wobei hier kurz die Orthomyxoviren Influenza A, B und C exemplarisch vorgestellt werden sollen. Die Entdeckung, daß diese Viren Erythrozyten

binden und agglutinieren, wurde bereits 1941 erstmalig beschrieben (HIRST, 1941; MCCLELLAND und HARE, 1941). Jedoch erst Anfang der 1980er Jahre wurde die Bindungsspezifität für Sia erkannt (ROGERS und PAULSON, 1983; HIGA *et al.*, 1985; ROGERS *et al.*, 1985). Alle Myxoviren exprimieren drei Enzyme auf ihrer Oberfläche: Das Hämagglutinin, welches an die Wirtszellenoberflächenglykane bindet, das die Rezeptordeterminante ablösende Rezeptor-zerstörende Enzym (RDE) und das Fusionsprotein, um die Virusmembran mit der der Wirtszelle zu verschmelzen. Für Influenza A und B-Viren stellen Fusionsprotein und Hämagglutinin ein Molekül dar (HA-Protein), während das RDE, eine Neuraminidase (N-Protein), ein eigenes Protein bildet. Bei Influenza C-Viren findet man alle drei Enzymaktivitäten auf einem Protein (HEF-Protein). Im Unterschied zu den erstgenannten Vertretern ist die Bindungsspezifität für Influenza C-Viren nicht auf terminale Neu5Ac, sondern auf terminale Neu5,9Ac₂ beschränkt, die auch in der menschlichen Nasenschleimhaut vorkommt und gerne als analytisches Mittel zur Erkennung Sialat-9-O-azetylierter Sialoside eingesetzt wird (ZIMMER *et al.*, 1994; HARMS *et al.*, 1996; HUBL *et al.*, 2000). Ein Coronavirus mit der ersten viralen Sialat-4-O-Azetyleraseaktivität wurde kürzlich beschrieben (REGL *et al.*, 1999). Neben viraler Erkennung sind vor allen Dingen viele bakterielle, sialinsäurevermittelte Erkennungsprozesse bekannt geworden, die notwendig sind, um den Wirtsorganismus erfolgreich zu infizieren und dort weiter zu proliferieren. So geben einige sialinsäurebindende *Escherichia coli*-Stämme Anlaß zu Krankheiten wie Diarrhoe und Meningitis. Bestimmte Streptokokkenstämme sind die ersten Bakterien, die sich sialinsäurevermittelt auf frischgeputzten Zähnen niederlassen, und einige Stämme des mit Gastritis und Magenkrebs in Zusammenhang gebrachten Bakteriums *Helicobacter pylori* kolonialisieren das unter der Muzinschicht liegende Epithel des Magentraktes. Dabei wird die Kolonialisierung dieser Stämme durch α 2,3-gebundene Sia vermittelt (HIRMO *et al.*, 1996).

Im Folgenden werden Beispiele für die Maskierung der subterminalen Struktur angeführt. Viele der bekannten Glykokonjugatrezeptoren sind Galaktose-spezifisch und die in den Glykanen terminal gebundene Galaktose ist oftmals durch Sia maskiert. Das in dieser Hinsicht bekannteste Beispiel und gleichzeitig erste durchcharakterisierte Tierlektin ist der galaktosespezifische Asialoglykoproteinrezeptor der Hepatozyten (ASHWELL und MORELL, 1974). Nur voll sialylierte Proteine werden von diesem Rezeptor nicht gebunden und verbleiben im Blutkreislauf. Je mehr Sialylgruppen durch Sialidasen entfernt werden, umso wahrscheinlicher ist die Erkennung der freigelegten Galaktoseeinheiten durch den Rezeptor und damit die Endozytose von Proteinen oder Zellen. Auch die 120-tägige Lebenszeit von Erythrozyten wird auf diese Weise mitkontrolliert (JANCIK und SCHAUER, 1974; JANCIK *et al.*, 1975; JANCIK *et al.*, 1978).

Auf unangenehme Weise hat sich der Hepatitis B-Virus diesen Mechanismus zu Nutze gemacht, um seinen Wirt zu infizieren (TREICHEL *et al.*, 1994). Andererseits zeigte ein durch Mutation sialylierter *Streptokokken*-Stamm eine hohe Resistenz gegen Phagozytose und dadurch eine erhöhte Virulenz (WIBAWAN und LAMMLER, 1991; WIBAWAN und LAMMLER, 1991). Weitere Rezeptoren dieser Art sind Kupffer-Zellen (Leber-Makrophagen) (KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1982, KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1983), und der Kontaktinhibin-Rezeptor, der das einlagige Wachstum von in Kultur gehaltenen Fibroblasten gewährleistet (GRADL *et al.*, 1995).

1.4 O-Azetylierte Sialinsäuren

Innerhalb der Sialinsäureforschung wird dem Gebiet der Sialat-O-Azetylierung seit einiger Zeit große Bedeutung zugemessen, da erkannt worden ist, daß diese Art der Modifizierung in vielen biologischen und pathophysiologischen Prozessen mitwirkt.

Übersichtshalber wird eine Einteilung in Glycerolseitenketten-O-azetylierte Sia und Ring-O-azetylierte oder 4-O-azetylierte Sia getroffen. Da die Glycerolseitenkette drei alkoholische Funktionen trägt, ist das in der Natur vorkommende Muster dieser O-Azetylierung entsprechend komplex. Darüberhinaus kommen beide Arten der O-Azetylierung in einem Molekül vor. Die für Kohlenhydrate oftmals beobachtete Regel der Migration von O-Azetylgruppen "down the chain" trifft auch für Sia zu, da sich Mono-7- oder 8-O-azetylierte Sia — insbesondere in saurem oder schwach alkalischem Milieu — schnell in die 9-O-azetylierte Species verwandeln. An der Existenz einer reinen Mono-8-O-azetylierten Sialinsäure werden Zweifel gehegt, da es dafür bisher keine direkten analytischen Nachweis gibt. Eine O-Azetylgruppe an C-4 gibt aufgrund der molekularen Umgebung keinen Anlaß zur Migration (KAMERLING *et al.*, 1987).

1.4.1 Vorkommen und Bedeutung der Sialat-Seitenketten-O-Azetylierung

Sialat-Seitenketten-O-Azetylierung ist sehr weit verbreitet und wird in den einzelnen Organismen gewebs- und entwicklungspezifisch exprimiert. So findet man im Muzin des menschlichen Colons einen hohen Gehalt aller Seitenkettenvarianten, der allerdings während der Kanzerogenese zurückgeht (MANN *et al.*, 1997). Ebenfalls sind Mäuse, Ratten, Hühner und Kaninchen bekannte Vertreter für die Expression seitenketten-O-azetylierter Sia (SHI *et al.*, 1996); (BUTOR *et al.*, 1993b; HERRLER *et al.*, 1987; KLEIN und ROUSSEL, 1998). Selbst einige *E.coli*-Stämme bauen Neu5,9Ac₂ oder Neu5,7,9Ac₃ in die Kapsel oder das O-Antigen des LPS ein (DMITRIEV *et al.*, 1977; GAMIAN *et al.*, 1992). Die bisher in Bezug auf Quantität, aber auch Vielfalt reichhaltigste Quelle solcher Sia bietet das Unterkieferspeicheldrüsenmucin vom Rind (REUTER *et al.*, 1983).

Die Bedeutung der Seitenketten-*O*-Azetylierung von Sia wird seit längerem erforscht. Dementsprechend liegen auch viele Ergebnisse vor, die allgemein als Einfluß der Sialat-*O*-Azetylierung beschrieben werden. Da diese Sialinsäuremodifikation ebenfalls auf der extrazellulären Matrix bzw. sezernierten Glykokonjugaten exprimiert wird, war ein Einfluß auf Zell-Zell-Wechselwirkungen zu erwarten. So wurde Neu5,9Ac₂ als onto- und onkogenes Antigen mehrfach beschrieben (VARKI, 1992), Neu5,9Ac₂-GD3 auf neuroektodermalen Zellen als Differenzierungsantigen ein entwicklungsregulierender Einfluß zugeschrieben (MURRAY *et al.*, 1986) und die Neu5,9Ac₂-GD3-Expression *in vitro* mit Phasen der Zell-Migration, axonalem Wachstum und Ausbildung zentraler, retinaler Verknüpfungen korreliert (ARAUJO *et al.*, 1997; CONSTANTINE-PATON *et al.*, 1986). Wurde in transgenen Mäusen die natürliche 9-*O*-Azetylierung durch eine künstlich exprimierte Sialat-9-*O*-Azetylerase *in vivo* entfernt, so blieb die Entwicklung befruchteter Eizellen im Zwei-Zell-Stadium stehen; entsprechende Induktion der De-*O*-azetylierung führte in Retina und Nebennierendrüse zu Abnormalitäten (VARKI *et al.*, 1991). Die 9-*O*-Azetylierung auf Mäuseerythrocyten verhinderte das Anbinden des Kontrollproteins Faktor H im Komplementsystem und leitete somit eine Lyse der Erythrocyten durch den damit induzierten alternativen Weg ein (SHI *et al.*, 1996). Neu5,7Ac₂-GD3 dient als Zielepitop auf T-Zellen und induziert in der Folge eine intensivere Proliferation (KNIEP *et al.*, 1995). Nicht zuletzt wird die Anbindung von Influenza A- und B-Viren durch das Hämagglutinin blockiert, ein Beispiel für die nicht-immunogene Abwehr durch das Muzin des Respirationstraktes (SUZUKI, 1990). Andererseits ist gerade das Sialat-9-*O*-azetylierte Muzin der Nasenschleimhaut Angriffspunkt und Bindungspartner des Hämagglutinins von Influenza C-Viren. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine 9-*O*-Azetylierung der Sialinsäuren auf den Erythrocyten der Maus die Bindung von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, verhindert (KLOTZ *et al.*, 1992).

Auch die Aktivität vieler Sialidasen und *N*-Azetylneuraminat-Pyruvat-Lyase wird durch die *O*-Azetylierung der Seitenkette besser unterbunden, je höher der Azetylierungsgrad ist (CORFIELD *et al.*, 1986). Die Bindung von Lektinen wird im Falle der Selektine CD22 und Sn durch Neu5,9Ac₂-Strukturen ebenfalls unterbunden (KELM *et al.*, 1994b).

1.4.2 Vorkommen und Bedeutung der Sialat-4-*O*-Azetylierung

4-*O*-Azetylierte Sia sind von der Forschung bisher wenig beachtet worden. Ein Grund mag ihr fehlendes Vorkommen bei uns Menschen sein. Entsprechend gering ist die Anzahl publizierter Ergebnisse. Da aber die Sialinsäureanalytik in den letzten Jahren einfacher und wesentlich sensibler geworden ist, stieg parallel die Anzahl der neuentdeckten 4-*O*-Ac-Sia-tragenden Species.

Bis jetzt ist die Sialat-4-*O*-Azetylierung in einem japanischen Weißfisch (INOUE *et al.*, 1989), im Gift einer südamerikanischen Viper (LOCHNIT und GEYER, 1995), dem australischem Monotrem Echidna (KAMERLING *et al.*, 1982), im Pferd und Esel (SCHAUER *et al.*, 1997) und neben dem Meerschweinchen (HANAOKA *et al.*, 1989) noch in Kaninchen (KLEIN und ROUSSEL, 1998) gefunden worden. Andere Annahmen, Neu4,5Ac₂ wären in Maus (ACCILI *et al.*, 1996; MENGHI *et al.*, 1996; MENGHI *et al.*, 1998) und Insektenlarven (KARAFALI *et al.*, 1999) bzw. Neu4Ac5Gc in Colonkarzinoma des Menschen (HIGASHI *et al.*, 1985; MIYOSHI *et al.*, 1986) enthalten, haben sich bisher nicht oder nicht eindeutig bestätigen lassen.

Im Vergleich zum seitenkettenmodifizierten Saccharid ist die Funktion 4-*O*-azetylierter Sia wenig erforscht. Der wohl bekannteste Effekt solcher Modifikation ist ihre Schutzfunktion gegenüber katabolischen Enzymen, wie Sialidasen und *N*-Azetylneuraminat-Pyruvat-Lyasen (CORFIELD *et al.*, 1986; SMITH *et al.*, 1999). Untersuchungen von α_2 -Makroglobulinen, die in ihrem Sialinsäuregehalt sowohl 4-*O*-azetyliert, als auch 4-OH-frei waren, zeigten keinerlei Auswirkungen der 4-*O*-Azetylierung auf die untersuchte inhibitorische Wirkung gegenüber Influenza-Viren. Stattdessen scheinen die terminal $\alpha_{2,6}$ -gebundenen Neu4,5Ac₂-Moleküle das Protein eher gegen den enzymatischen Abbau selbst zu schützen (PRITCHETT und PAULSON, 1989). Darüberhinaus gibt es keine Beweise dafür, daß Neu4,5Ac₂ als Ligand für endogene Rezeptoren dienen könnte, wie dies für die 9-*O*-azetylierte Verbindung berichtet wurde (VARKI, 1997). Allerdings könnte die Entdeckung der ersten viralen Sialat-4-*O*-Azetylerase in Maus-Hepatitisviren (MHV), die ausschließlich junge Mäuse über ihr Gehirn infizieren, einen Hinweis in diese Richtung geben (REGL *et al.*, 1999). Obwohl in ausgewachsenen Mäusen bisher nicht eindeutig eine 4-*O*-Azetylierung nachgewiesen werden konnte, wäre eine altersabhängige Expression möglich.

Eine Übersicht über die in der Natur gefundenen *O*-Azetylderivate von Sia gibt Tabelle 1.

Zu Tabelle 1 auf der folgenden Seite:

‡ In einer von Schauer 1979 (SCHAUER, 1979) vorgeschlagenen und allgemein akzeptierten *Nomenklatur* werden dem als *Neu* abgekürzten Neuraminsäurekern die Substituenten in (i) alphabetischer und (ii) numerisch aufsteigender Position angefügt. Die im Molekül von den Substituenten eingenommene Position wird der Substituentenabkürzung vorangestellt. Mehrfach auftretende Substituenten werden nur einmal genannt und der Mehrfachsubstitution durch eine entsprechende Indexnotierung an der Substituentenabkürzung Rechnung getragen.

Literaturreferenzen auf die sich in Tabelle 1 beispielhaft bezogen wird:

- | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| [1] (KAMERLING <i>et al.</i> , 1982) | [6] (REUTER <i>et al.</i> , 1983) | [11] (MANZI <i>et al.</i> , 1990) |
| [2] (HANAOKA <i>et al.</i> , 1989) | [7] (KOGAN <i>et al.</i> , 1992) | [12] (IWASAKI <i>et al.</i> , 1990) |
| [3] (INOUE <i>et al.</i> , 1989) | [8] (GAMIAN <i>et al.</i> , 1992) | [13] (KLUGE <i>et al.</i> , 1992) |
| [4] (LOCHNIT und GEYER, 1995) | [9] (BERGWERFF <i>et al.</i> , 1992) | |
| [5] (KAMERLING <i>et al.</i> , 1987) | [10] (SHUKLA <i>et al.</i> , 1987) | |

Tabelle 1: Übersicht über die natürlich vorkommenden *O*-azetylierten Sialinsäuren. Literaturbeispiele sind in eckigen Klammern angegeben und werden in der Legende erklärt.

<i>O</i> -Azetyl-Sialinsäure	Abkürzung [†]	Beispielspezies
5- <i>N</i> -Azetyl-4- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu4,5Ac ₂	Huftiere, Monotrem [1], Meerschweinchen [2], Weißfisch [3], Viper [4].
5- <i>N</i> -Azetyl-7- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,7Ac ₂	weitverbreitet, auch in Bakterien. [5]
5- <i>N</i> -Azetyl-8- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,8Ac ₂	Rind, auch in Bakterien. [5, 6]
5- <i>N</i> -Azetyl-9- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,9Ac ₂	Mensch, weitverbreitet, auch in Bakterien. [5]
5- <i>N</i> -Azetyl-4,9-di- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu4,9Ac ₂	Pferd [1]
5- <i>N</i> -Azetyl-7,9-di- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,7,9Ac ₃	Rind [6], auch in Bakterien. [7, 8]
5- <i>N</i> -Azetyl-8,9-di- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,8,9Ac ₃	Rind [6]
5- <i>N</i> -Azetyl-7,8,9-tri- <i>O</i> -azetylneuraminsäure	Neu5,7,8,9Ac ₄	Rind [6]
5- <i>N</i> -Azetyl-4- <i>O</i> -azetyl-9- <i>O</i> -lactylneuraminsäure	Neu4,5Ac ₂ 9Lt	Pferd [1]
5- <i>N</i> -Azetyl-9- <i>O</i> -azetyl-8- <i>O</i> -methylneuraminsäure	Neu5,9Ac ₂ 8Me	Seestern [9]
5- <i>N</i> -Azetyl-9- <i>O</i> -azetyl-2-deoxy-2,3-didehydroneuraminsäure	Neu2en5,9Ac ₂	In Urin und Gewebe von Tieren. [10]
4- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu4Ac5Gc	Huftiere [1]
7- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu7Ac5Gc	weitverbreitet in höheren Tieren [6]
8- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu8Ac5Gc	Rind [6]
9- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu9Ac5Gc	weitverbreitet in höheren Tieren [6]
7,9-di- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu7,9Ac ₂ 5Gc	Rind [6]
8,9-di- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu8,9Ac ₂ 5Gc	Rind [6]
7,8,9-di- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu7,8,9Ac ₃ 5Gc	Rind [6]
9- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolyl-8- <i>O</i> -methylneuraminsäure	Neu9Ac5Gc8Me	Seestern [9]
7,9-di- <i>O</i> -Azetyl-5- <i>N</i> -glykolyl-8- <i>O</i> -methylneuraminsäure	Neu7,9Ac ₂ 5Gc8Me	Seestern [11]
9- <i>O</i> -azetyl-2-deoxy-2,3-didehydro-5- <i>N</i> -glykolylnneuraminsäure	Neu2en9Ac5Gc	In Urin von Tieren. [10]
9- <i>O</i> -Azetyl-2-keto-3-deoxynononsäure	Kdn9Ac	Fisch [12]
<i>N</i> -(<i>O</i> -Azetyl)-glykolylnneuraminsäure	Neu5GcAc	Thrombocyten von Ratten [13]

1.5 Sialinsäuremetabolismus

Das Ereignis der Sialat-*O*-Azetylierung schließt sich als einer der letzten Schritte in der Synthese von Sialosiden an, die im Zytosol mit der Synthese freier Neu5Ac aus Glukose-6-P in einer neun Schritte umfassenden Enzymreaktion beginnt. Das Schlüsselenzym der Regulation ist hier die UDP-*N*-Azetylglukosamin-2'-epimerase (HORSTKORTE *et al.*, 1999). In der entscheidenden achten der neun Enzymreaktionen wird Neu5Ac-9-P aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und *N*-Azetylmannosamin-6-P gebildet, welches dann abschließend de-phosphoryliert wird. Kdn-9-P entsteht in der gleichen Reaktion aus PEP und Mannosamin-6-P.

Die Aktivierung der freien Neu5Ac zum Zuckernukleotid CMP-Neu5Ac geschieht abweichend von anderen bekannten Nukleotidzuckerbiosynthesen im Nukleus. Über das Zytosol, wo CMP-Neu5Ac durch die Monooxygenase CMP-Neu5Ac-Hydroxylase zu CMP-Neu5Gc modifiziert werden kann, tritt das Zuckernukleotid über einen Antiporter in den Golgi-Apparat ein, wo durch akzeptor- und bindungsspezifische Sialyltransferasen die Sialinsäure auf die verschiedenen Glykane der Glykokonjugate übertragen wird. Erst jetzt werden die α -glykosidisch gebundenen Sia 8-*O*-methyliert oder *O*-azetyliert. Die Schritte anderer Modifikationen wie Laktylierung, Sulfatierung oder Phosphorylierung konnten bisher nicht geklärt werden.

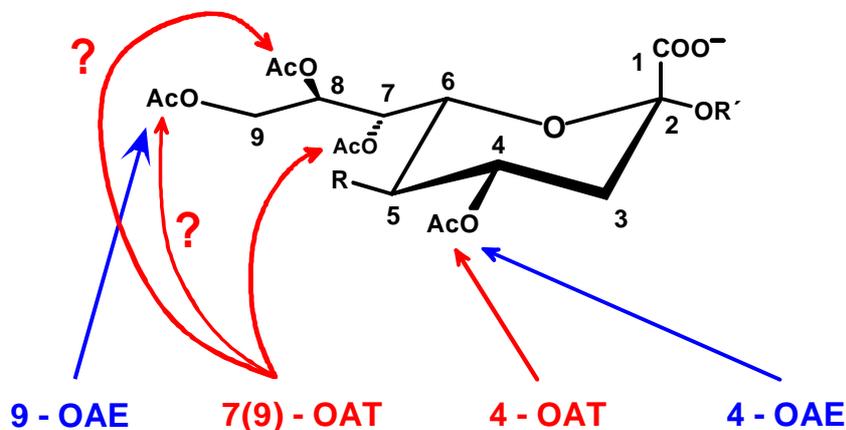


Abbildung 4: Enzyme des Sialat-*O*-Azetylmabolismus.

OAT = Sialat-*O*-azetyltransferasen (EC 2.3.1.44/45).
 OAE = Sialat-*O*-azylesterasen (EC 3.1.1.53).

Die Regioselektivität der Reaktionen ist durch die jeweils vorangestellte Zahl gegeben. Die in Klammern gesetzte 9 impliziert die Diskussion über eine chemische bzw. enzymatische Migration der *O*-Azetylgruppe von C-7 zu C-9.

Mögliche Substituenten für Rest R sind unter Abbildung 2 zu finden. Rest R' ist meistens Gal, GalNAc, GlcNAc oder Sia (vgl. dazu auch 1.1).

Grundsätzlich werden für die *O*-Azetylierung von Sia zwei Enzyme postuliert, die Sialat-9-*O*-Azetyltransferase und die Sialat-4-*O*-Azetyltransferase (Abbildung 4 in Rot dargestellt). Von beiden Enzymen konnte die membrangebundene Lokalisierung im Golgi-Apparat nachgewiesen

werden (DIAZ *et al.*, 1989; IWERSEN *et al.*, 1998; VANDAMME-FELDHAUS und SCHAUER, 1998). Ein cytosolisches Enzym in der Submandibulardrüse des Rindes wird diskutiert (SCHAUER *et al.*, 1988b).

Während die Sialat-4-*O*-Azetylierung kein Problem bezüglich der Regioselektivität darstellt, verhält es sich bei der Sialat7(9)-*O*-Azetyltransferasereaktion anders, denn es tritt die grundsätzliche Frage auf, wie die unterschiedlichen *O*-Azetylierungsmuster der Glycerolseitenkette zustande kommen. Drei Möglichkeiten sind hier zu diskutieren:

1. Es gibt mehrere regioselektiv agierende Sialat-*O*-azetyltransferasen.
2. Es gibt nur ein Enzym, das die Glycerolseitenkette regioselektiv an 7-OH *O*-azetyliert und der weitere *O*-Azetylierungsprozeß durch
 - a) chemisch induzierte Migration der *O*-Azetylgruppe zum Kettenende mit anschließender Neo-*O*-Azetylierung der freigewordenen 7-OH-Position, oder
 - b) enzymatisch induzierte Migration der *O*-Azetylgruppe zu einer der zwei freien OH-Gruppen mit folgender Neo-*O*-Azetylierung der freigewordenen 7-OH-Gruppe stattfindet.

An dieser Stelle muß vorweggenommen werden, daß noch keine eindeutigen Ergebnisse für die Beantwortung dieser Frage existieren. Dennoch gibt es bezüglich der Migration Hinweise in beide Richtungen, die die chemische Migration unter geeigneten Bedingungen (KAMERLING *et al.*, 1987, SCHAUER *et al.*, 2000), im Falle der mikrosomalen Sialat-7(9)-*O*-Azetyltransferase aber auch die enzymatische Migration (VANDAMME-FELDHAUS und SCHAUER, 1998) untermauern. Ob indessen mehrere regiospezifische Enzyme nebeneinander existieren, ist noch gänzlich ungeklärt. Keine eindeutigen Erkenntnisse gibt es für die Organisation der OAT, die zwar der weitläufigen Meinung Golgi-Membran-ständig, aber darüberhinaus offenbar abhängig von weiteren Proteinen (ein möglicher AcCoA-Transporter wird bezüglich der 9-OAT propagiert) Diaz, 1989; (KANAMORI *et al.*, 1997; BORA *et al.*, 2000) bzw. Co-Faktoren ist, wie sich dies im Falle der 4-OAT im Meerschweinchen verhält.

Der Sialinsäurekatabolismus wird in Gang gesetzt durch die enzymatische Hydrolyse der Sia durch Sialidasen. Wie bereits erläutert, beeinflussen bzw. verhindern *O*-azetylierte Vertreter den Abbau durch diese Enzyme beträchtlich. Aus diesem Grund muß in solchen Fällen der Abbau durch entsprechende Sialat-4-*O*-, bzw. Sialat-9-*O*-Esterasen, die schon in vielen Geweben nachgewiesen worden sind (SCHAUER *et al.*, 1988a; SCHAUER *et al.*, 1989; BUTOR *et al.*, 1993a), eingeleitet werden (Abbildung 4 [in Blau dargestellt](#)). Erst nach De-*O*-azetylierung und hydrolytischer Spaltung durch lysosomale Sialidasen können die freien Sia entweder wieder in den

anabolischen Prozeß eingeführt werden oder aber weiter durch *N*-Azetylneuraminat-Pyruvat-Lyasen zu Pyruvat und *N*-Azylmannosaminen gespalten werden (Abbildung 5).

Zu Abbildung 5 auf der folgenden Seite:

Kurzschema der metabolischen Wege von Sia in einer eukaryontischen Zelle. Die angegebenen Nummern entlang des Metabolismuspfs representieren enzymatische Reaktionen. Der jeweilige Enzymname und die zugehörige Klassifizierung in der EC-Nomenklatur sind in untenstehender Tabelle 2 nachzulesen.

Tabelle 2: Es sind die wichtigsten am Sialinsäuremetabolismus beteiligten Enzyme aufgeführt. Die Legendenzahl bezieht sich auf die auf der folgenden Seite präsentierte Abbildung.

Legendenzahl	Enzym	EC-Nomenklatur
1	Glukosephosphatisomerase	5.3.1.9
2	Glukosamin-6-phosphat-Synthase	5.3.1.19
3	Azetyl Coenzym A:Glukosamin-6-phosphat- <i>N</i> -Azetyltransferase	2.3.1.4
4	<i>N</i> -Azetylglukosamin-6-phosphat-Mutase	2.7.5.2
5	UDP- <i>N</i> -Azetylglukosaminpyrophosphorylase	2.7.7.23
6	UDP- <i>N</i> -Azetylglukosamin-2'-Epimerase	5.1.3.8
7	<i>N</i> -Azetylmannosaminkinase	2.7.1.60
8	<i>N</i> -Azylneuraminat-9-phosphat-Synthase	4.1.3.19
9	<i>N</i> -Azylneuraminat-9-phosphatase	3.1.3.29
10	CMP-Neu5Ac-Synthase (Neu5Ac-Cytidyltransferase)	2.7.7.43
11	CMP-Neu5Ac-Hydroxylase	1.14.99.18
12	Sialyltransferasen	2.4.99.1.xx
13	Azetyl Coenzym A:Sialat-4- <i>O</i> -Azetyltransferase bzw. Azetyl Coenzym A:Sialat-7(9)- <i>O</i> -Azetyltransferase	2.3.1.44 2.3.1.45
14	Sialat-4- <i>O</i> -Azylesterase bzw. Sialat-9- <i>O</i> -Azylesterase	3.1.1.53
15	Neuraminidasen (Sialidasen)	3.2.1.18
16	<i>N</i> -Azylneuraminat-Pyruvat-Lyase	4.1.3.3

Enzymreaktionen 1-9 und 11 sind im Zytosol lokalisiert. Die CMP-Neu5Ac-Synthasereaktion (10) ist im Nukleus, die der Sialyltransferasen (12) und der Sialat-*O*-azetyltransferasen (13) sind im Golgi-Apparat lokalisiert. Vor der Sialidasereaktion (15) wird im Falle vorhandener Sialat-*O*-azetylierter Glykokonjugate der katabolische Weg durch Sialat-*O*-Azylesterasereaktionen (14) eingeleitet. Werden Sia nicht auf dem Anabolismusweg recycled, findet im Zytosol der Abbau der Sia durch die *N*-Azylneuraminat-Pyruvat-Lyase (16) statt.

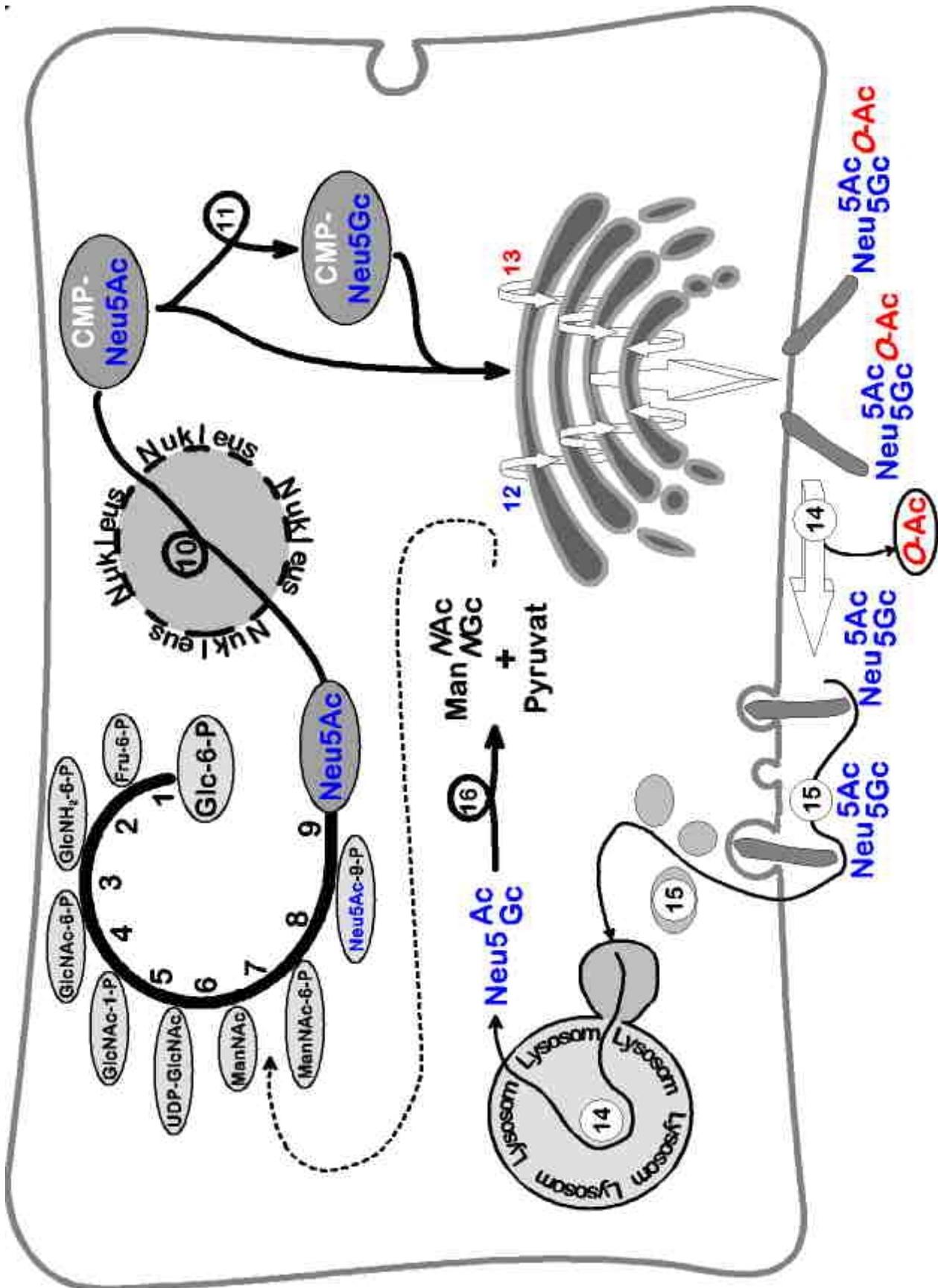


Abbildung 5: Schema der Hauptwege des Sialinsäuremetabolismus in einer eukaryotischen Zelle. Für weitere Informationen vgl. S. 21.

In Bezug auf 8-*O*-methylierte Sia-Vertreter, die bisher lediglich in Seesternen gefunden wurden und nicht durch Sialidasen gespalten werden können, liegen keine Erkenntnisse über katabolische Wege vor.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Viele Versuche wurden seit der Entdeckung der OAT Anfang der 1970er Jahre (SCHAUER, 1970a) unternommen, eines dieser Enzyme durch klassische Reinigung oder molekularbiologisch sauber zu erhalten. Trotzdem ist eine Reinigung bis heute noch nicht geglückt. In Anbetracht der immer weiter wachsenden Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung der *O*-Azetylierung in regulatorischen und pathogenen Prozessen, würde eine gereinigte OAT ein großes Spektrum neuer Möglichkeiten öffnen. Dies kann von der Beantwortung des Reaktionsmechanismus über die Expression und Lokalisation in den unterschiedlichen Geweben bis hin zur Entwicklung neuer Pharmazeutika reichen.

1989 wurde erstmals über das Vorkommen von Sialat-4-*O*-Azetylierung im Meerschweinchen α_2 -Makroglobulin berichtet (HANAOKA *et al.*, 1989; PRITCHETT und PAULSON, 1989), einem Serumglykoprotein, das aller Voraussicht nach in der Leber synthetisiert wird. Nach Bestätigung des Vorkommens von Neu4,5Ac₂ in Meerschweinchenserum, -leber und -Golgi-Membranen, sowie dem Nachweis einer in Meerschweinchenleber membrangebundenen hochaktiven 4-OAT (IWERSEN *et al.*, 1998), sollte der Versuch unternommen werden, dieses Enzym aus den Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen zu lösen, zu reinigen und schließlich zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material (mit Abkürzungen)

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

[³ H]AcCoA ([³ H]Azetyl-Coenzym A)	Moraveck Biochemicals, Brea (Cal.), U.S.A.
AcCoA (Azetyl-Coenzym A), Trilithiumsalz	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A.
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
3', 5'ADP (Adenosin-3',5'-diphosphat), Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure, 100 %	Merck, Darmstadt
Ammoniaklösung, 25 %	Merck, Darmstadt
AMP (Adenosinmonophosphat), Mononatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
c-AMP (zyklisches AMP), Mononatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Arabinose	Merck, Darmstadt
Araldit M	Ciba Geigy, Wehr
Argon/Methan-Gemisch (10 % Methan)	Messer-Griesheim, Lübeck
ATP (Adenosintriphosphat), Trinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
α 2,3-N-Azetylsialyllaktosamin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
α 2,6-N-Azetylsialyllaktosamin	
BCA (2,2'-Bischinolin-4,4'-Dikarbonsäure)-ProteinbestimmungsReagenz	Pierce, Rockfort, Illinois, U.S.A.
Blei(II)nitrat	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Boehringer, Mannheim
Butan-1-ol	Riedel de Haen
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
CMP (Zytidinmonophosphat)	Sigma, Deisenhofen
CMP[4,5,6,7,8,9- ¹⁴ C]Neu5Ac	Amersham, Braunschweig
CMP-Neu5Ac	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
CoA (Coenzym A), Trilithiumsalz	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A.
Colominsäure	Sigma, Deisenhofen
DePeX	Serva, Heidelberg
3'-Dephospho CoA	Sigma, Deisenhofen
Desulfo CoA	Sigma, Deisenhofen
DFP (Diisopropylfluorophosphat)	Sigma, Deisenhofen

DIDS (4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilben- disulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Disialogangliosid GD2	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Disialogangliosid GD3	Snowbrand, Tokyo, Japan
DMB (1,2-Diamino-5,6-methylendioxybenzol)	Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan oder Fluka, Buchs, Schweiz
Doderylbernsteinsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Biomol, Hamburg
EDTA, Tetranatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Eisen(III)chlorid	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 100 %	Merck, Darmstadt
Essigsäureethylester	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetuin	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
Formvar	Sigma, Deisenhofen
Fruktose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
Galaktose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
Glukose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
Glutardialdehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
HY 960-Härter	Ciba Geigy, Wehr
IDP (Inosindiphosphat)	Sigma, Deisenhofen
IMP (Inosinmonophosphat)	Sigma, Deisenhofen
ITP (Inosintriphosphat)	Sigma, Deisenhofen
Kakodylsäure, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Kalium-, Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Laktose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
Laktosylceramid	Gabe von Dr. Bernhard Kniep, Institut für Immunologie der Technischen Universität Dresden.
Magnesiumchloridheptahydrat	Merck, Darmstadt
α_2 -Makroglobulin, human	Sigma, Deisenhofen
Mangan(II)chloridtetrahydrat	Merck, Darmstadt
Mannose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Monosialogangliosid GM1b	Matreya Incorporation, Japan

Monosialogangliosid GM2	Matreya Incorporation, Japan
Monosialogangliosid GM3	Matreya Incorporation, Japan
Disialogangliosid GD1a	Matreya Incorporation, Japan
Disialogangliosid GD1b	Matreya Incorporation, Japan
Trisialoganagliosid GT1b	Matreya Incorporation, Japan
Tetrasialogangliosid GT1b	Matreya Incorporation, Japan
MOPS ((3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure)	Merck, Darmstadt
NADH (Nikotinamidadenindinukleotid), Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
NADPH (Nikotinamidadenindinukleotid-phosphat), Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogensulfit (37 %)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumzitat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Neu2en5Ac (2-Desoxy-2,3-Didehydro- <i>N</i> -AzetylD-neuraminsäure)	Boehringer, Mannheim
Neu5Ac (<i>N</i> -Azetyl-D-neuraminsäure)	Snowbrand, Tokio, Japan
Neu5Ac-Dimer (α 2,8-gebunden)	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Neu5Ac-Tetramer (α 2,8-gebunden)	
Orcinol (3,5-Dihydroxytoluol)	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Pantothensäure	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
<i>p</i> -CMB (<i>para</i> -Chlormercuribenzoat)	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc [®] (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylchlorid-hydrochlorid)	Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
Phthalsäuredi- <i>n</i> -butylester	Merck, Darmstadt
PLP (Pyridoxalphosphat)	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A
PMSF (Phenylmethylsulfonylchlorid)	Sigma, Deisenhofen
Primulin	Sigma, Deisenhofen
Propan-1-ol	BASF, Ludwigshafen
Propionsäure, 99 %	Merck, Darmstadt
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
Pyridin	Merck, Darmstadt
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Merck, Darmstadt
Sialidase aus <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Boehringer, Mannheim
Sialidase aus Newcastle Disease Virus	Boehringer, Mannheim
Sialidase aus <i>Vibrio cholerae</i>	Behring Diagnostics GmbH, Marburg
Sialyl Lewis ^x -Tetrasaccharid	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Lübeck
Szintillationsflüssigkeit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Transferrin, bovin	Sigma, Deisenhofen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan), ultra pure	ICN, Aurora, Ohio, U.S.A
Triton X-100 (Nonaethylenglykol-oktylphenol-ether)	Biomol, Hamburg
TWEEN 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)	Fluka, Buchs, Schweiz
Uranylazetat	Merck, Darmstadt
Zink(II)chlorid	Merck, Darmstadt
Zwittergent 3-14 (3-(<i>N,N</i> -Dimethyldodekylammonia)-propansulfonat)	Fluka, Buchs, Schweiz

2.1.2 Chromatographische Materialien

Anionenaustauscherharz Dowex 2 × 8, 200-400 mesh, Chloridform	Fluka, Buchs, Schweiz
Azetonitril für die HPLC	Promochem, Wesel
BioGel P2	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Cibacron Blue F3G-A-Agarose	ICN, Aurora (Ohio), U.S.A.
CoA-Agarose	Sigma, Deisenhofen
DC-Fertigplatten, Zellulose auf Glas, 20 × 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm	Merck, Darmstadt
DEAE (Diethylaminoethyl)-Sepharose, Chloridform	Sigma, Deisenhofen
Fractogel [®] EMD TMAE (2-Trimethylethylammonium)-650 (S)	Merck, Darmstadt
HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 auf Glas, 10 × 10 cm, Schichtdicke 0.1 mm	Merck, Darmstadt
Iatrobeads 6RS-8060	Iatron Laboratories, Inc., Tokio, Japan
Kationenaustauscherharz, Dowex 50 W × 8, 20-50 mesh, Natriumform	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol für die HPLC	Promochem, Wesel
RP-18 HPLC-Säule, Lichrospher 100, 4 × 250 mm, Partikelgröße 5 µm	Merck, Darmstadt
RP-18 HPLC-Vorsäule, Lichrospher 100, 4 × 10 mm, Partikelgröße 5 µm	Merck, Darmstadt
Sepak [™] , C18-Chromatographiemedium	Waters, Milford (massachusetts), U.S.A.
S-Sepharose	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Zellulose 2100 ff	Macherey & Nagel, Düren
Zellulosetrizeat-Ultrafiltrationsmembran, MWCO 10 kD	Sartorius AG, Göttingen

2.1.3 Biologisches Material

Biologische Materialien ausgewachsener, meist weiblicher Meerschweinchen wurden vom Pharmakologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel erhalten.

Rindersubmandibulardrüsen waren eine Gabe des *Schlachthofes Wellsee* in Kiel.

Pferdesubmandibulardrüsen und Pferdeblut waren eine Gabe der *Fleischzentrale Nord* in Lübeck.

2.1.4 Sonstige Materialien

Centrex Zentrifugaleinheiten UF-0.5 und –2 (10 und 30 kDa)	Schleicher & Schuell, Dassel
Grids, Kupfernetze, Hex 460 DB, 3.05 mm, Mikrotiterplatten, flachbödig, aus PVC	Polaron Equipment Ltd., Watford, England Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten, flachbödig, schwarz, aus PVC	Sarstedt, Nümbrecht
Quarküvetten, 1 ml (10 × 4 × 45 mm)	Hellma, Müllheim
Ultrafiltrationsmembran, Zellulosenitrat, 0.2 µM	Sartorius AG, Göttingen
Ultrafiltrationsmembran, Zellulosetrizetat, MWCO 10 kD	Sartorius AG, Göttingen
Visking Dialyseschlauch, Porengröße 8-15 kDa, Durchmesser 16 mm	Serva, Heidelberg

2.1.5 Geräte und Datenverarbeitungsprogramme

Agfa-Snapscan mit Bildbearbeitungsprogramm Fotolook, Version 2.09	Agfa, Leverkusen
Digital-pH-Meter	Knick, Berlin
Eppendorf Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5436	
HPLC-System bestehend aus: Programmierbarer Pumpe L-6220, Fluoreszenz-Durchflußspektralphotometer F1050, Interface D-6000 und Datenverarbeitungssoftware HPLC Manager Version 2.0	Merck-Hitachi, Darmstadt
oder	
Isochratische Pumpe, Spectroflow 400 Fluoreszenz-Durchflußspektralphotometer F1100 und Datenverarbeitungssoftware Chromstar, Version 3.10	Kratos Anal. Systems, Ramsey (NJ), U.S.A. Merck-Hitachi Bruker,
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotor JA17	Beckman, München

Labor-Tischzentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenphotometer, Titertek Multiscan-MC	Flow Laboratories, Uxbridge, U.K.
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 100	Heidolph, Kelheim
Mikrotom Om U2	Reichert, New York, U.S.A
Mikrotom Ultracut E	Reichert, New York, U.S.A
Niederdruckchromatographie-System: Peristaltische Schlauchpumpe P-1, UV-Durchflußdetektor LKB Monitor UV-1, Fraktionssammler SuperFrac, Flachbettschreiber LKB REC 102	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Potter-Elvehjem-Homogenisatoren	Braun, Melsungen
Potter-Homogenisator für Eppendorf Reaktionsgefäße	Walter Ebel, Hamburg
Programm Enzfitter, Version 1.05 (H)	Elsevier Biosoft, Cambridge, U.K.
Radiodünnschichtscanner Tracemaster 40 mit Datenverarbeitungssoftware Chroma, Version 7.29	Berthold, Wildbad
Rotationsverdampfer	Büchi, Schweiz
Tischultrazentrifuge, Optima™ TLX mit Rotor TLA45	Beckman, München
Ultrafiltrationsrührzelle, 10 ml	Amicon, Witten
Ultraturrax IKA T25	Jahnke & Kunkel, Staufen
Ultrazentrifuge L7-65 mit Rotoren 45 Ti und SW28	Beckman, München
UV/Vis-Spektralphotometer U 2000	Merck-Hitachi, Darmstadt
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

2.1.6 Nomenklatur der in dieser Arbeit vorkommenden Enzyme

Ausgeschriebener Enzymname	Enzymnamenabkürzung	EC-Nomenklatur
<i>N</i> -Azylnuraminat-Hydrolase	Sialidase	EC 3.2.1.18
Azetyl-CoA:Sialat-4- <i>O</i> -Azetyltransferase	4-OAT	EC 2.3.1.44
Azetyl-CoA:Sialat-7(9)- <i>O</i> -Azetyltransferase	9-OAT	EC 2.3.1.45
<i>N</i> -Azylnuraminat-4- <i>O</i> -Azetylesterase	4-OAE	EC 3.1.1.53
<i>N</i> -Azylnuraminat-9(4)- <i>O</i> -Azetylesterase	9-OAE	EC 3.1.1.53
Sialyltransferase	Sialyltransferase	EC 2.4.99.xx

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

2.2.1.1 Präparation freier Sialinsäuren

Die Präparation freier Sia beinhaltet drei generelle Schritte, die Säurehydrolyse, die Dialyse oder Ultrafiltration und den Ionenaustausch. Jeder dieser Schritte war in verschiedenen Artikeln Gegenstand reger Diskussion, um insbesondere den Verlust *O*-azetylierter Sia zu minimieren (REUTER und SCHAUER, 1994; VARKI und DIAZ, 1984; MAWHINNEY und CHANCE, 1994). Eine eindeutige Antwort, wie der geringste Verlust an Sia in Kauf genommen werden kann, sollte der eigenen Entscheidung nach Studium der Literatur zufallen. Die in dieser Arbeit verbrauchten freien Sia wurden wie folgt präpariert:

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Neu4,5Ac₂ wurde aus Pferdeunterkieferspeichelmuzin, Neu5Gc und Neu5,9Ac₂ aus Rinderunterkieferspeichelmuzin erhalten. Darüberhinaus bot letztgenanntes Muzin einen großen Pool anderer mono-, di-, oder oligoseitenketten-*O*-azetylierter Sia. Drüsen, die frisch bei der Schlachtung anfielen wurden, um einer enzymatischen De-*O*-azetylierung durch Sialat-*O*-azetylerasen vorzubeugen, sofort weiterverarbeitet. Die Drüsen mußten möglichst klein zerteilt und anschließend mit einem Fleischwolf und einem Ultraturrax oder einem ähnlichen Gerät homogenisiert werden. Das Muzin wurde mit viel niederkonzentriertem Phosphatpuffer (pH 6) in einem Sieb aus dem Homogenat ausgewaschen, wobei mehrere Liter muzinhaltigen Puffers anfielen. Nachfolgend wurde das Muzin durch Senken des pH-Wertes auf pH 3 durch Zugabe dreimolarer Ameisensäure unter stetem Rühren ausgefällt und mehrere Stunden im Kühlraum belassen. Das gefällte und geklumpfte Muzin wurde durch 2000 × g-Zentrifugation mehrfach pelletiert und so gut es geht resuspendiert und gewaschen. Die sich anschließende zweimolare Propionsäurehydrolyse (pH 2.3) erstreckte sich bei 80 °C über 4 h. Nach 1 h wurde die Hydrolyse unterbrochen, die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH wenn nötig nachkorrigiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde die Hydrolysemischung auf Eis abgekühlt und über Nacht erschöpfend gegen das 10-20-fache Volumen bidestilliertes Wasser dialysiert, wobei das Wasser nach 2, 6 und 10 h komplett gewechselt und gesammelt wurde. Bei Bedarf, wie bei der quantitativen Sialinsäurebestimmung einer Substanz, konnte mit dem Dialyseschlauchinhalt eine zweite stärkere Säurehydrolyse mit 0.1 M Salzsäure (pH 1) für 1 h mit einer sich anschließenden zweiten erschöpfenden Dialyse durchgeführt werden. Für die Bestimmung *O*-azetylierter Sia ist die zweite Hydrolyse allerdings nicht zu empfehlen, da die Ausbeute *O*-azetylierter Sia infolge hoher De-*O*-azetylierung nur noch gering sein wird (↑ 3.7.1). Die vereinten Dialysate wurden am Rotationsverdampfer über mehrere Stunden

bei 30 °C auf ein Volumen von 200 ml eingeengt und lyophilisiert. In 10 ml Wasser resuspendiert wurde die Probe nach Abtrennen unlöslicher Bestandteile durch $100\,000 \times g$ -Zentrifugation auf eine Dowex 50W \times 8-Kationenaustauschsäule (20-50 mesh, protonierte Form) aufgetragen und mit dem 10-20-fachen Säulenvolumen bidestilliertem Wasser eluiert. Eventuelle kationische Bestandteile wurden so von den Sia abgetrennt. Für 0.5 mg erwartete Sia wurde 1 ml Ionenaustauscherharz verwendet. Das Kationenaustauschereluat war nun je nach Konzentration der zuvor vorhandenen Kationen angesäuert und mußte mit 2 M Ammoniaklösung auf pH 5 bis 6 angehoben werden, um einer Seitenketten-*O*-Azetylmigration vorzubeugen (\uparrow 1.4.1). Die Lösung wurde sofort danach auf eine Dowex 2 \times 8 Anionenaustauschersäule (200-400 mesh, Formiatform) aufgetragen und die Säule mit dem 10-20-fachen Volumen bidestillierten Wassers gewaschen. Auf je 0.5 mg erwarteter Sia kam 1 ml Anionenaustauscherharz zum Einsatz. Die Waschphase wurde aufgefangen, lyophilisiert und auf Sia überprüft (\uparrow 2.2.2.3.1). Bei positivem Ergebnis mußte die Waschphase nochmals über den Anionenaustauscher geschickt werden. Die Anionenaustauschsäule wurde schließlich entweder mit dem 10-20-fachen Volumen 0.8 M Ameisensäure oder über einen linearen Ameisensäuregradienten (0-0.8 M Ameisensäure) eluiert und fraktioniert. Bei Fraktionierung wurde ein kleiner Teil des Fraktionsvolumens abgenommen, lyophilisiert, auf Sia überprüft (\uparrow 2.2.1.2) und die positiven Fraktionen gepoolt. Nach Lyophilisation des Eluats wurde der Sia-Gehalt quantifiziert und analysiert (\uparrow 2.2.1.2, 2.2.2.3.1). Andere Gewebe oder Körperflüssigkeiten verlangten andere Vorbereitungen. Während Seren direkt oder nach einer ersten Dialyse hydrolysiert werden konnten, gestaltete sich die Analyse von Leber schwieriger und wurde manchmal durch eine Etherextraktion des Gewebes eingeleitet, um störende Lipide zu entfernen.

2.2.1.2 Quantifizierung von Sialinsäuren

2.2.1.2.1 Orcinol/Eisen(III)/Salzsäure-Assay

Für die quantitative colorimetrische Bestimmung von zwischen 2 und 8 μg freier oder glykosidisch gebundener Sia enthaltenden Proben wurde die in 100 μl Probenvolumen vorliegende Probe mit 100 μg des Orcinol/Fe(III)/HCl-Reagenzes versetzt, kräftig geschüttelt und für 15 min bei 95 °C erhitzt. Nach fünfminütigem Abkühlen der Mischung auf Eis wurde das Reaktionsgefäß für wenige Sekunden anzentrifugiert, um die am Gefäßdeckel kondensierten Tropfen wieder mit der Mischung zu vereinen, bevor das violette Chromophor mit 700 μl Isoamylalkohol für 15 s unter kräftigem Schütteln extrahiert wurde. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin für 5 min bei $14\,000 \times g$ zentrifugiert und 500 μl der oberen organischen Phase bei 572 nm photometriert. Die Quantifizierung konnte anhand einer im oben genannten Konzentrationsbereich angefertigten Eichgerade durchgeführt werden. Die Werte der Eichgerade und der Proben wurden

stets dreifach bestimmt.

Das Reagenz setzt wie folgt zusammen:

Zweihundert Milligramm Orcinol werden in 1 ml einer einprozentigen Eisen-(III)-chloridlösung (w/v) und 81.4 ml konzentrierter Salzsäure gelöst, mit aqua bidest auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt und gut durchmischt.

Für die Analyse von auf Kieselgel 60-Dünnschichtchromatographieglasplatten entwickelten freien oder glykosidisch gebundenen Sia wurde die Platte mit Hilfe eines Zerstäubers mit verdünntem Reagenz besprüht und in einer flachen Glaskammer bei 120 °C für 20 min entwickelt. Die Proben wurden als violette Banden sichtbar. Die Nachweisgrenze auf Kieselgel 60-Dünnschichtplatten betrug etwa 2 µg. Für auf Zellulose-Dünnschichtplatten entwickelte Proben betrug die Entwicklungszeit bei 120 °C nur 15 min, und die Nachweisgrenze betrug aufgrund der leichten Hintergrundfärbung lediglich etwa 3 µg.

Das verdünnte Reagenz setzte sich aus drei Teilen unverdünntem Reagenz und einem Teil aqua bidest zusammen.

2.2.1.2.2 Quantifizierung über HPLC

Sia konnten auch über die Methode nach Hara *et al.* (↑ 2.2.2.3.1) quantifiziert werden. Dazu wurde nach Derivatisierung von 1 µg Neu5Ac eine Verdünnungsreihe angefertigt, so daß 3 Konzentrationen mit jeweils 55, 11, 2.7, µM derivatisierter Neu5Ac vorlagen. Von jeder Konzentration wurden mindestens in Doppelbestimmungen 10, bzw. 20 µl injiziert und analysiert. Die Peakintegrationswerte wurden daraufhin gegen die Neu5Ac-Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt, anhand der sich der Sialinsäuregehalt anderer Proben errechnen ließ. Voraussetzung für diese Auswertungsart war das identische Fluoreszenzverhalten gleicher Konzentrationen verschiedener Sia.

2.2.1.3 Primulin-Färbung (SKIPSKI, 1975)

Die unspezifische Färbung von auf Kieselgel 60-Dünnschichtplatten entwickelten Lipiden durch den Fluoreszenzfarbstoff Primulin wurde durch Besprühen der Platte mit Primulinreagenz und anschließendem kalten Trockenfönen durchgeführt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 380 nm konnten Lipide als blau- bis grünfluoreszierende Banden erkannt werden. Ganglioside erschienen stets als grünfluoreszierende Banden. Das Primulinreagenz setzte sich zusammen aus 0.01 Prozent Primulin (w/v) in einem Lösungsmittelgemisch aus Azeton und aqua bidest im Verhältnis 4:1 (v/v).

Eine Färbung durch Primulin störte eine anschließend durchgeführte Bial-Färbung nicht.

2.2.1.4 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Meerschweinchenleberhomogenaten, -solubilisaten und den Fraktionen der einzelnen Chromatographien erfolgte mit dem BCA-Proteintest. Hierfür wurden in flachbödigen Mikrotiterplatten 100 µl der Proteinlösung mit 100 µl des BCA-Reagenzes, das zuvor frisch nach Angaben des Herstellers angesetzt worden war, versetzt, einige Sekunden auf einem Mikrotiterplattenschüttler durchmischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Abkühlen der Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur durch ein Mikrotiterplattenphotometer bei 562 nm. Der Proteingehalt wurde schließlich anhand einer mit BSA im Bereich zwischen 0 und 20 µg/ml erstellten Eichgerade ermittelt.

2.2.1.5 Elektronenmikroskopie von Leberschnitten und Golgi-Membranpräparationen

Für die Elektronenmikroskopie von Meerschweinchenleberschnitten wurde ein etwa 10 mg schweres Stück frischer Leber in Sörensen Puffer für 48 h bei 4 °C fixiert. Im Falle der aus der gleichen Leber präparierten Golgi-Membranen wurde eines der erhaltenen Pellets (↑ 2.2.1.11) auf die gleiche Weise fixiert und im Anschluß nach Sörensen in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2), der 3 % (w/v) Glutardialdehyd enthielt nachfixiert. Die so fixierten Präparate wurden anschließend in 2 %igem Osmiumtetroxid 4 h lang kontrastiert und über 18 h mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen entwässert. Einer vierstündigen Behandlung in Propylenoxid folgte eine 20-stündige Behandlung in einem Gemisch, das zu gleichen Teilen aus Araldit:Propylenoxid bestand. Abschließend erfuhren die Präparate eine achtstündige Behandlung in 7 % Phthalsäuredi-*n*-butylester enthaltendem Araldit und eine 16-stündige in dem gleichen frischengesetzten Araldit. Nach Anpolymerisation der Präparate im Vakuumschrank bei 50 °C für 2 h erfolgte die Auspolymerisation dann für 48 h bei 65 °C.

Auf einem Mikrotom Om U2 wurden aus den auf entsprechenden Trägern aufgeklebten, vorgesägten Aralditpräparaten mit einem Glasmesser 1-3 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Auf einem Mikrotom Ultracut E wurden hiervon 0.5 µm dicke Schnitte für eine orientierende Lichtmikroskopie angefertigt, mit Toluidinblau/Pyronin (pH 8.15) (ROMEIS, 1989) gefärbt und mit DePeX eingedeckt. Etwa 70 nm dicke Schnitte wurden daraufhin mit einem Diamantmesser (Diatome MT 2683) auf obigem Mikrotom in Serie angefertigt und auf benetzte Grids positioniert, die staubfrei getrocknet und 12 min lang mit Uranylazetat und 7 min lang mit Bleizitrat kontrastiert wurden. Die abschließende elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte an den Elektronenmikroskopen Zeiss EM 9 und Zeiss TEM 902 ESI am Anatomischen Institut der Universität Kiel durch Dr. med. Friedrich Paulsen.

2.2.1.6 Gangliosidextraktion

2.2.1.6.1 In Anlehnung an die Methode nach Folch (FOLCH *et al.*, 1957) modifiziert nach Ledeen und Yu (LEDEEN und YU, 1982)

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Je 100 g kleingeschnittenes Feuchtgewebe wurden in 250 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert und das Homogenat jeweils dreimal 10 min mit dem 1.5 fachen Volumen Chloroform/Methanol (1:2; v/v) und Chloroform/Methanol (2:1; v/v) extrahiert. Nach jeder Extraktion wurde mittels zehnmütiger 2000 × g-Zentrifugation sedimentiert und der Überstand gesammelt. Die Extrakte wurden gesammelt, am Rotationsverdampfer bei 30 °C auf 50 ml eingengt, nach Zugabe von 200 ml bidestilliertem Wasser nochmals auf 50 ml eingengt und schließlich lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand wurde in 200 ml Chloroform/Methanol (2:1; v/v) aufgenommen und mit je 40 ml 0.1 M Natriumchloridlösung dreimal ausgeschüttelt. Die wäßrigen Phasen wurden gesammelt, am Rotationsverdampfer bei 30 °C auf ein Volumen von 50 ml eingengt und anschließend wie unter 2.2.1.8 erschöpfend gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Der Dialyseschlauchinhalt wurde schließlich lyophilisiert. Das so erhaltene Glykolipidhextrakt wurde über DEAE-Anionenaustausch (↑ 2.2.2.2.2), SepakTM-Chromatographie (↑ 2.2.2.2.3) und Iatrobeadschromatographie (↑ 2.2.2.2.4) weiter aufgearbeitet.

2.2.1.6.2 Nach der Methode von Ladisch *et al.* modifiziert nach Senn *et al.*

Eine andere Methode der Gangliosidextraktion wurde durch Ladisch *et al.* 1985 beschrieben (LADISCH und GILLARD, 1985). Diese Methode zeichnet sich durch einen sehr geringen Phospholipidanteil bei der Extraktion aus und wird als für die Extraktion von Serumgangliosiden besonders geeignet beschrieben. Eine verbesserte Variante wurde durch Senn *et al.* 1989 beschrieben (SENN *et al.*, 1989). Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Zehn ml lyophilisiertes Meerschweinchenserum wurden in 12 ml Diisopropylether/Butan-1-ol (60:40; v/v) im Ultraschallbad und durch Schütteln für mehrere min extrahiert, 6 ml 50 mM Natriumchloridlösung hinzugegeben und das Gemisch mit Unterbrechungen für 15 min stetig geschüttelt. Die obere organische Phase wurde vorsichtig entfernt und die wäßrige Phase nochmals mit dem gleichen Volumen des organischen Lösungsmittelgemisches extrahiert. Die wäßrige Phase wurde lyophilisiert und das Lyophilisat mit Hilfe von Ultraschall in 14 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde nun über SepakTM-Chromatographie (↑ 2.2.2.2.3), danach über DEAE-Anionenaustausch (↑ 2.2.2.2.2) und schließlich über Iatrobeadschromatographie (↑ 2.2.2.2.4) weiter aufgearbeitet.

2.2.1.7 Säurehydrolyse freier und gebundener Neu4,5Ac₂ sowie freier Neu5,9Ac₂

2.2.1.7.1 Freie Neu4,5Ac₂ und Neu5,9Ac₂

Je 0.5 µg Neu4,5Ac₂ bzw. Neu5,9Ac₂ wurden in je 200 µl 0.1 und 0.01 M Salz-, 0.5 M Ameisen-, 2 M Essig- oder 2 M Propionsäure gelöst und über verschiedene Zeiten bei 80 °C (im Falle von 0.01 M Salz- und 0.5 M Ameisensäure bei 70 °C) hydrolysiert und wie im vorigen Abschnitt beschrieben analysiert.

2.2.1.7.2 Neu4Ac5Gc-GM3

Je 1 µg des Monosialogangliosids Neu4Ac5Gc-GM3 wurde in jeweils 400 µl 0.1 M Salz-, 0.5 M Ameisen-, 2 M Essig- oder 2 M Propionsäure über verschiedene Zeiten bei 80 °C (im Falle von Ameisensäure bei 70 °C) hydrolysiert. Die Analyse erfolgte wie im vorigen Abschnitt beschrieben.

2.2.1.7.3 Meerschweinchenserum

2.2.1.7.3.1 Ohne Detergenz

Zwei µl Serum wurden hierbei in 150 µl 2 M Propionsäure gelöst und bei 80 °C für 4 h hydrolysiert. Nach Lyophilisation wurde der Rückstand nach direkter Derivatisierung mit DMB per RP-HPLC analysiert (↑ 2.2.2.3.1). Für eine Überprüfung der Zeitabhängigkeit der Hydrolyse in verschiedenen Säuren wurden je 2 µl Serum mit 150 µl der jeweiligen Säure (0.1 und 0.01 M Salz-, 0.5 M Ameisen-, 2 M Essig- oder 2 M Propionsäure) versetzt und für verschiedene Zeiten bei 80 °C (im Falle von 0.01 M Salz- und 0.5 M Ameisensäure bei 70 °C) hydrolysiert und wie oben beschrieben analysiert.

2.2.1.7.3.2 Mit Detergenz

Die Propionsäurehydrolyse von Meerschweinchenserum wurde auch über verschiedene Zeiten in Gegenwart des Detergenzes CHAPS untersucht. Dazu wurde wie im vorigen Abschnitt verfahren, der Propionsäure jedoch noch 20 mM CHAPS zugesetzt.

2.2.1.8 Präparation von Asialofetuin

Zehn mg Fetuin wurden in 5 ml 0.1 M Salzsäure in einem 10 ml Spitzkolben gelöst und eine Stunde bei 80 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf Eis abgekühlt, in einen Dialyseschlauch umgefüllt und über Nacht gegen 100 ml aqua bidest bei 4 °C erschöpfend dialysiert, wobei das Wasser nach 2, 6 und 10 h gewechselt wurde. Der Dialyseschlauchinhalt wurde lyophilisiert, wobei das Asialofetuin als farblose Substanz gewonnen wurde. Die Ausbeute betrug 95 %.

2.2.1.9 Präparation des GD3-Tetrasaccharids

2.2.1.9.1 Ozonolyse

Es wurden 130 mg GD3 in 21 ml trockenem Trichlormethan/Methanol (2:1, v/v) gelöst und in einem Azeton/Trockeneisbad auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Anschließend wurde so lange ein trockener Ozongasstrom eingeleitet, bis sich die Lösung durch überschüssiges Ozon dunkelblau verfärbte und der Gasstrom für weitere 10 min aufrecht erhalten. Die Lösung wurde über 30 min durch einblasen von Stickstoffgas vom überschüssigen Ozon befreit, wobei sich die Lösung langsam wieder entfärbte. Während dieser 30 min wurde die Reaktionsmischung gemächlich auf Raumtemperatur erwärmt. Um eventuell gebildete Peroxide zu zerstören, wurden der Lösung 100 μl einer 72 mg in 1 ml Methanol gelöstem Thioharnstoff zugesetzt, wobei allerdings kein Thioharnstoffdioxid ausfiel, weswegen auf eine weitere Zugabe verzichtet wurde.

2.2.1.9.2 β -Eliminierung

Am Rotationsverdampfer wurde obige Lösung bis fast zur Trockene eingengt und der Rückstand in 30 ml 1 M Natriumkarbonatlösung aufgenommen. Nach einer 15-sekündigen Behandlung der trüben Lösung im Ultraschallbad ergab sich eine klare, leicht gelbliche Lösung, die folgend für 3 h bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert wurde. Die Reaktionsmischung vertiefte hierbei ihre Farbe und wurde wieder trübe. Nach Abkühlen auf Eis und Neutralisation durch Eisessig wurde das Reaktionsgemisch bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer 10 ml Amicon-Zelle über einen Zellulosetriazetatfilter 10 kD-ultrafiltriert. Das farblose, das Tetrasaccharid enthaltende Filtrat wurde lyophilisiert.

2.2.1.9.3 Größenausschlußchromatographie

Um das Tetrasaccharid von Salz und anderen Saccharidnebenprodukten zu reinigen, wurde eine Größenausschlußchromatographie mit wäßrigem Pyridiniumazetat (pH 5) durchgeführt. Dazu wurde das Chromatographiematerial über Nacht in Wasser bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gequollen und in einer $1.6 \times 50\text{ cm}$ Glassäule mit dem zehnfachen Volumen der Pyridiniumazetatlösung bei einer Flußrate von 0.6 ml/min equilibriert. Für die Chromatographie wurde das Lyophilisat des Ultrafiltrats in 10 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen, durch $2000 \times g$ -Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen getrennt und der klare, farblose Überstand in fünf Säulenläufen zu je 2 ml Auftragsvolumen bei einer Flußrate von 0.6 ml/min chromatographiert. Fünfzig μl einer jeden 4.5 ml enthaltenden Fraktion wurde unter Vakuum getrocknet und mit dem Bial-Test (\uparrow 2.2.1.2.1) auf Anwesenheit von Sia überprüft. Die positiven Fraktionen eines Peaks wurden gepoolt, lyophilisiert und auf Kieselgel-60-DC analysiert (\uparrow 2.2.2.1.2.3). Nach Refraktionierung der Probe (dem obigen Muster folgend in einem einzigen Lauf) wurde die Substanz nach Lyophilisation über Kationenaustausch an Dowex 50W \times 8 (20-50 mesh, protonierte Form) in

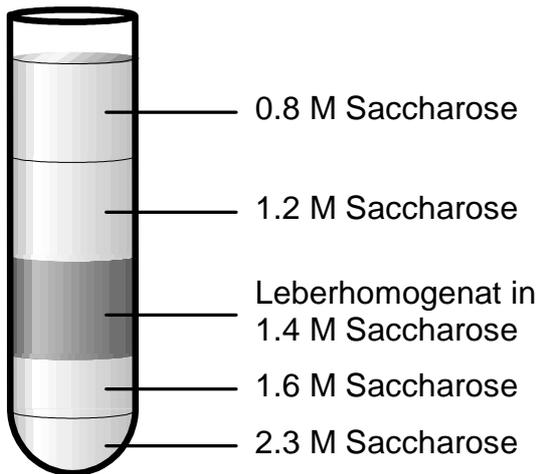
die freie Säure überführt, lyophilisiert und der Neu5Ac-Gehalt der Probe quantifiziert (↑ 2.2.1.2.1).

2.2.1.10 Präparation intakter Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Leber wurde den Meerschweinchen sofort nach der Tötung entnommen und in eiskaltem 0.01 M Tris-HCl Puffer (pH 7.4), der 0.25 M Saccharose enthielt, transportiert. Im Folgenden wird nur noch von Tris-Saccharose-Puffer gesprochen werden. pH und Tris-Konzentration liegen dabei stets in der schon oben gegebenen Weise vor. Wird eine Molarität genannt, so bezieht sich diese auf die Saccharosekonzentration.

Die Leber, die zwischen 20 und 40 g wog, wurde dem Meerschweinchen nach der Tötung durch Genickbruch sofort entnommen und in eiskaltem, 0.25 M Tris-Saccharose-Puffer des pH-Wertes 7.4 transportiert. Die Leber wurde von überschüssigem Fett- und Bindegewebe befreit, kurz mit eiskaltem Tris-Saccharose-Puffer (0.25 M Saccharose) gewaschen und in wenig dieser Lösung in einer Petrischale mit Hilfe eines Skalpell kleinste zerschnitten. Die kleingeschnittene Leber wurde danach in einen 60 ml-Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt und das Volumen auf 50 ml mit Tris-Saccharose-Puffer (0.25 M Saccharose) ergänzt. Nach der Homogenisierung bei Leistungsstufe acht und mit 3 Hüben wurden 47.5 ml des Homogenats mit Tris-Saccharose-Puffer (2.3 M Saccharose) auf ein Endvolumen von 108 ml aufgefüllt. Nach intensivem Durchmischen erhielt man so das endgültige Tris-Saccharose-Puffer-Homogenat (1.4 M Saccharose). Für die sich anschließende Ultrazentrifugation wurden noch Tris-Saccharose-Puffer der Saccharose-Molaritäten 2.3, 1.8, 1.2 und 0.8 vorbereitet.

Mit einer 10 ml-Pipette wurden nun in 30 ml-Ultrazentrifugationsröhrchen ein aus fünf Konzentrationen bestehender Saccharosegradient aufgebaut. Zu unterst befanden sich 3 ml der 2.3 M Saccharoselösung, auf die mit Vorsicht 3 ml der 1.6 M Saccharoselösung pipettiert wurden. In der Mitte des Gradienten folgten 9 ml des Homogenats und abschließend je 9 ml des 1.2 und 0.8 M Gradientenmediums (Abbildung 6).

**Abbildung 6:**

Schichtungsschema des diskontinuierlichen Saccharose-dichtegradienten zur Präparation intakter Golgi-Membranen aus der Meerschweinchenleber.

Sofort nach dem Aufbau des Gradienten erfolgte eine $90.000 \times g$ -Ultrazentrifugation in einem Ausschwing-Rotor (SW28-Ti) für 90 min. Es wurden 2 Läufe mit je 6 Gradienten durchgeführt. Die Golgi-Membranen waren nach der Zentrifugation neben 3 weiteren Bereichen als etwa zwei Millimeter dicke, milchig trübe Bande zwischen 0.8 und 1.2 M Saccharoselösung zu erkennen. Nach jedem Lauf wurden diese Schichten vorsichtig mit einer Pasteurpipette abpipettiert und in einem 250 ml-Standzylinder, in dem 100 ml 0.01 M Tris-Puffer des pHs 7.4 vorgelegt waren, vereint. Das Volumen wurde mit weiterem Puffer auf 200 ml aufgefüllt und davon je 50 ml in vier Beckman-45Ti-Ultrazentrifugationsgläser verteilt, die anschließend bei $100.000 \times g$ für eine halbe Stunde ultrazentrifugiert wurden. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen und der Zentrifugationsrückstand mit 1 ml 0.01 M Tris-Puffer (pH 7.4) abgelöst, in Beckman-Microfuge Tubes überführt und erneut bei $100.000 \times g$ in einer Tischultrazentrifuge in einem Festwinkel-Rotor für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zentrifugationsrückstand bis zum Gebrauch bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.2.1.11 Präparation von Meerschweinchenserum

Den Meerschweinchen wurde sofort nach ihrem Tod (s.o.) die Kehle durchgeschnitten, das Blut in einem 30 ml-Zentrifugengefäß aus Glas aufgefangen und auf Eis gelagert. Vor der 20 minütigen Zentrifugation in einem JA-17 Rotor bei $5000 \times g$ wurde das geronnene Blut im Glasröhrchen mit einem Skalpell zerschnitten. Der nach der Zentrifugation erhaltene, klare, rötlich gefärbte Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, ohne diesen durch Teile des Pellets oder des auf dem Überstand schwimmenden Lipidanteils zu verunreinigen. Das so erhaltene Serum wurde bei $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Für Untersuchungen, bei denen das unbehandelte Serum in enzymatischen Testansätzen verwendet werden sollte, wurden zuvor im Serum vorhandene Esterasen durch DFP irreversibel inhibiert. Dazu wurde im Serum eine 1 mM DFP-Konzentration eingestellt und 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$

stehen gelassen. Anschließend wurde das Serum erschöpfend gegen Wasser dialysiert (vergleiche hierzu 2.2.1.1) und der Dialyseschlauchinhalt weiter verwendet.

2.2.1.12 Erythrozytenpräparation

2.2.1.12.1 Native Erythrozyten

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

Frisches Blut wurde durch sofortige Durchmischung mit 130 mM Zitratpuffer (pH 6.1) im Volumenverhältnis 4:1 an der Koagulation gehindert. Nach einer zehnmütigen 1500 × g-Zentrifugation wurden das Plasma und vor allen Dingen die Leukozyten-/Thrombozytenschicht (das Buffy-Coat) sehr vorsichtig abgesaugt. Die verbliebenen Erythrozyten wurden nun dreimal mit dem zehnfachen Volumen PBS (140 mM Natriumchlorid, 2.7 mM Kaliumchlorid, 8 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1.5 mM Kaliumdihydrogenphosphat) gewaschen, bis der Überstand fast farblos erschien, jeweils wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Durch Lagerung in AMAB (Alsevier's Medium mit Antibiotika, hier ohne Antibiotika, 30 mM Natriumzitrat (pH 6.1), 77 mM Natriumchlorid, 114 mM Glukose) und täglichem Wechsel des Puffers konnten die Erythrozyten mehrere Tage intakt gehalten werden.

2.2.1.12.2 Erythrozytenmembranen (Ghosts)

Nach (↑ 2.2.1.12.1) präparierte Erythrozyten, wurden im zehnfachen Volumen PBS resuspendiert und unter Rühren langsam in das 40-fache Volumen Natriumphosphatpuffer (5 mM, pH 7.2) getropft, wobei die Erythrozyten hypotonisch lysierten.

Die Erythrozyten-Ghosts wurden folgend bei 25 000 × g zentrifugiert, das lose aufliegende Pellet vorsichtig aufgenommen und das feste Sediment verworfen. Nach fünfmaligem Waschen und Zentrifugieren der Erythrozyten-Ghosts auf diese Weise, wurden die Ghosts auf den Gehalt und das Muster von Sia geprüft (↑ 2.2.1.2.1, 2.2.2.3.1), teils de-*O*-azetyliert (↑ 2.2.1.13) und als Pellets bei -20 °C eingefroren.

2.2.1.12.3 Fixierte Erythrozytenmembranen

Die Fixierung nativer Erythrozytenmembranen geschah durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd. Dazu wurden in PBS gewaschene Erythrozytenmembranen in 100 ml PBS je 0.5 g Erythrozytenmembranenfeuchtgewicht mit dem gleichen Volumen 0.5 %iger Glutaraldehydlösung in PBS 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden bei 18 000 × g zentrifugiert, das Pellet in 100 ml 1 % Ethanolamin enthaltendem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Auf diese Weise wurde noch zwei weitere Male verfahren. Schließlich wurde das in dem gleichen Puffer resuspendierte Pellet für 1 h bei 4 °C belassen und die Membranen im

gewünschten Puffer durch Zentrifugations-Resuspensionsschritte äquilibriert. Die so erhaltenen Membranen wurden als Pellet bei $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (KELM *et al.*, 1998).

2.2.1.13 Alkalische Verseifung

Tritium-markierte Substanzen, die auf Dünnschichtplatten analysiert worden waren, wurden in entsprechend dimensionierten Dünnschichtchromatographieentwicklungskammern aus Glas in einer gesättigten Ammoniakatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur de-*O*-azetyliert. Die DC-Platten wurden anschließend intensiv unter einem Kaltluftstrom ammoniakfrei geblasen und erneut mit einem TLC-linear-analyzer auf verbliebene Radioaktivität überprüft.

In Lösung befindliche Substanzen wurden entweder für 30 min mit 0.1 M Natronlauge bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de-*O*-azetyliert, die alkalische Lösung mit 0.2 M Salzsäure neutralisiert oder nach Lyophilisation mit 25 prozentiger Ammoniaklösung für 8 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ behandelt und hiernach zum Entfernen des Ammoniaks zweimal lyophilisiert.

2.2.1.14 Sialat-*O*-Azylesterasetests

2.2.1.14.1 Unspezifisch mit 4-Methylumbelliferylazetat

Um allgemein eine *O*-Azylesteraseaktivität zu bestimmen, wurde das wenig fluoreszente Substrat 4-Methylumbelliferylazetat (MUAc) eingesetzt, das nach De-*O*-azetylierung in das fluoreszente Methylumbelliferon überführt wird. Das Reagenz wurde als 2 mM Lösung in Azeton/bidestilliertem Wasser (1:1; v/v) angesetzt und konnte so bei $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Reaktion wurde in einem Inkubationsvolumen von 100 μl in schwarzen, flachbodigen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches richtete sich nach der untersuchten Probe. Jeder Ansatz enthielt 40 μM MUAc. Die Inkubationszeit betrug bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischen 30 und 60 min Gestoppt wurde durch Zugabe von 100 μl Ethanol. Nach 10 min wurde die Lösung durch Zugabe von 100 μl 100 mM Phosphatpuffer (pH 8.0) alkalisch gemacht. In einem Mikrotiterplattenphotometer wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm bestimmt.

Sollte eine Esteraseaktivität quantitativ bestimmt werden, mußte parallel eine Eichung mit MU unter gleichen Zusammensetzungsbedingungen erfolgen. Dazu wurde die Fluoreszenz von MU-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 40 μM ermittelt.

2.2.1.14.2 Spezifisch mit Neu4,5Ac₂

Eine spezifische Sialat-4-*O*-Azylesteraseaktivität wurde mit der RP-HPLC-Analyse DMB-derivatisierter Sia nach Hara *et al.* bestimmt (\uparrow 2.2.2.3.1). Dazu wurde das Material, das auf eine 4-*O*-Azylesteraseaktivität geprüft werden sollte, in Gegenwart von 0.2 μg freier Neu4,5Ac₂ bei

37 °C unter gegebenen Inkubationsbedingungen für 1 h inkubiert und durch 5 minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt. Die Analyse erfolgte daraufhin durch RP-HPLC (↑ 2.2.2.3.1).

2.2.2 Chromatographien

2.2.2.1 Dünnschichtchromatographie

2.2.2.1.1 Auf Zellulose (REUTER und SCHAUER, 1994)

Freie und gereinigte Sia wurden in 1 cm breiten Bahnen auf 20 × 20 cm großen Zellulose-DC-Glasplatten aufgetragen. Die Auftragsorte befanden sich von der unteren Plattenkante in einem Abstand von 1 cm. Da die Proben in wäßriger Lösung vorlagen, wurde das Trocknen der Proben auf der DC-Platte durch kaltes Fönen beschleunigt. In Bezug auf das Detektionslimit des Bial-Tests wurden je zu analysierende Sialinsäure mindestens 3 µg aufgetragen. Für radioaktive Proben betrug die Nachweisgrenze weit weniger. Entwickelt wurden die Proben in einer mit dem Lösungsmittelgemisch aus Butan-1-ol, Propan-2-ol und 0.1 M Salzsäure im Volumenverhältnis 1:2:1 equilibrierten Glasentwicklungskammer. Die DC-Plattenentwicklung war beendet, sobald die Laufmittelfront einen halben Zentimeter unter der DC-Plattenoberkante stand, was je nach Raumtemperatur nach etwa 8 bis 12 h der Fall war. Die DC-Platte wurde daraufhin unter kalter Fönluft absolut trocken geblasen und die Sia durch entsprechende Methoden detektiert.

2.2.2.1.2 Auf Kieselgel 60

2.2.2.1.2.1 Ganglioside (KNIEP *et al.*, 1993)

Ganglioside und gelegentlich auch die freien Sia Neu5Ac und Neu4,5Ac₂ wurden auf dem gleichen Kieselgelplattentyp mit einem anderen Laufmittel analysiert. Es handelte sich dabei um Chloroform; Methanol; 20 mM wäßriges Kalziumchlorid im Volumenverhältnis 50:40:10. Die Entwicklungszeit betrug (je nach Raumtemperatur differierend) etwa 45 min.

2.2.2.1.2.2 Sialosaccharide (VEH *et al.*, 1981)

Sialosaccharide und freie Sia wurden auf Kieselgel 60-HPTLC-Glasplatten analysiert. Dazu wurden die Proben in 0.5 cm breiten Bahnen unter einem kalten Luftstrom auf 10 × 10 cm große Platten aufgetragen, wobei der Sialinsäuregehalt einer jeden mit dem Bial-Test zu detektierenden Spezies 6.5 nmol nicht unterschreiten sollte. Die Auftragsorte befanden sich von der unteren Plattenkante in einem Abstand von einem Zentimeter. Entwickelt wurden die Platten in einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol; Butan-1-ol; Pyridin; aqua bidest; Essigsäure im Volumenverhältnis 100:10:10:3:3. Die DC-Plattenentwicklung war beendet, sobald die Laufmittelfront einen halben cm unter der DC-Plattenoberkante stand, was nach etwa 2 h der Fall war. Vor der Visualisierung der chromatographierten Proben wurde die DC-Platte unter einem kalten Luftstrom sorgfältig getrocknet.

2.2.2.1.2.3 Oligosaccharide (MICHALSKI, 1995)

Für die Analyse des GD3-Tetrasaccharids (\uparrow 2.2.1.9) wurden Substanzen auf Kieselgel 60-HPTLC-Platten mit Ethanol; aqua bidest; Butan-1-ol; Pyridin; Essigsäure im Volumenverhältnis 100:30:10:10:3 entwickelt. Alle weiteren Bedingungen sind im vorigen Unterkapitel 2.2.2.1.2.2 nachzulesen.

2.2.2.2 Normaldruck-Säulenchromatographie

2.2.2.2.1 Für die Präparation freier Sialinsäuren (SCHAUER, 1970b)

Freie Sia wurden aus seiner Mischung durch Zellulose-Chromatographie fraktioniert. Das Zellulosepulver wurde in Butan-1-ol/Propan-1-ol/bidestilliertes Wasser (1:2:1; v/v/v) dispergiert und über 24 h in diesem Lösungsmittelgemisch belassen. Nach dreimaligem Waschen mit dem gleichen Lösungsmittel wurde das Chromatographiematerial unter leichtem Druck in eine 3×125 cm große Säule gegossen und bei 4°C 48 h mit dem Lösungsmittelgemisch bei einer Flußrate von 9 ml/h equilibriert. Maximal 100 mg des in 3.5 ml des Laufmittels gelösten Sia-Gemisches wurden auf die Säule aufgetragen und über mehrere Tage entwickelt. Aus den jeweils 9 ml umfassenden Fraktionen wurden 100 μl unter Vakuum getrocknet und mit dem Bial-Reagenz auf Sia getestet. Anhand einer Extinktionskurve über die Fraktionen wurden Pools gebildet, diese am Rotationsverdampfer bei 30°C auf ein Volumen von 10 ml eingengt und nach Zugabe von 50 ml bidestilliertem Wasser zweimal lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand wird nach der Methode von Hara *et al.* (\uparrow 2.2.2.3.1) analysiert.

2.2.2.2.2 DEAE-Ionenaustauschchromatographie (LEDEEN und YU, 1982)

Der Anionenaustauscher DEAE-Sepharose wird vor der Benutzung durch 5-malige Behandlung mit Chloroform/Methanol/5.5 M Ammoniumazetat (30:60:8; v/v/v) in die Azetatform überführt, mit Chloroform/Methanol/bidestilliertem Wasser (30:60:8; v/v/v) azetatfrei gewaschen und in einer 1.3×3 cm großen mit einer Sinterglasfritte versehenen Glassäule mit dem 5-fachen Volumen des Lösungsmittels equilibriert. Die in 10 ml des gleichen Lösungsmittels aufgenommene Probe wird anschließend bei einer Flußrate von 0.5 ml/min aufgetragen, die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen des Lösungsmittel gewaschen und schließlich mit dem 10-fachen Säulenvolumen Chloroform/Methanol/5.5 M Ammoniumazetat (30:60:8; v/v/v) eluiert. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer (bei 30°C) auf ein Volumen von 5 ml eingengt, mit 50 ml bidestilliertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Zum weiteren Entfernen des Ammoniumazetats wird der Lyophilisationsrückstand noch zweimal in 50 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen und zweimal lyophilisiert.

2.2.2.2.3 Sepak™-RP-18-Chromatographie (MÜTHING *et al.*, 1991)

Fabrikneues oder gebrauchtes Sepak™ Material wurde mehrfach im 5-10-fachen Volumen Chloroform gewaschen und in einer 1 × 1.5 cm dimensionierten Glassäule mit Glassinterfritte mit 10 ml Chloroform/Methanol (2:1), 10 ml Methanol, 10 ml entgastem bidestilliertem Wasser und 0.1 M entgaster Kaliumchloridlösung equilibriert. Die Probe wird in 2 × 5 ml entgaster 0.1 M Kaliumchloridlösung aufgetragen und die Säule nachfolgend erst mit 5 ml der Kaliumchloridlösung dann mit 10 ml entgastem bidestilliertem Wasser gespült. Die Flußrate betrug mit organischem Lösungsmittel 0.2 und mit wäßrigem Lösungsmittel etwa 0.1 ml/min. Eluiert wurde sukzessiv mit 10 ml Methanol und 10 ml Chloroform/Methanol (2:1; v/v). Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer (30 °C) auf ein Volumen von etwa 5 ml eingeeengt, der Rückstand mit 50 ml bidestilliertem Wasser verdünnt und anschließend lyophilisiert. Analyse erfolgte nach Lösen des Rückstandes in Chloroform/Methanol (2:1; v/v) auf Kieselgel 60-HPTLC-Platten wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.2.2.4 Iatrobeads-Kieselgelchromatographie in Anlehnung an (UENO *et al.*, 1978)

Vor der Chromatographie wurden Verunreinigungen aus dem fabrikneuen Material durch 5-10-maliges Waschen in Chloroform/Methanol/2.5 M Ammoniak (30:60:10; v/v) entfernt und anschließend mit Chloroform/Methanol/Wasser (30:60:10; v/v) ammoniakfrei gewaschen. Eine 1.3 × 2 cm große Glassäule mit Glassinterfritte wurde dann mit Chloroform/Methanol (85:15; v/v) equilibriert. Die getrocknete Probe wird in 10 ml Chloroform/Methanol (85:15; v/v) im Ultraschallbad resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Um Phospholipide und Sulfatide zu eluieren wurde mit dem 20-fachen Volumen des Laufmittels gewaschen und mit dem 20-fachen Volumen Chloroform/Methanol (1:2; v/v) eluiert (UENO *et al.*, 1978). Die Flußrate betrug jeweils etwa 0.5 ml/min. Nach Trocknung der Eluate durch Verdampfen des Großteils der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (30 °C) und Lyophilisation erfolgte die Analyse nach Lösen des Rückstandes in Chloroform/Methanol (2:1; v/v) auf Kieselgel 60-HPTLC-Platten wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

War die Trennung nicht wunschgemäß, wurde nach einer modifizierten Vorschrift gearbeitet (LEDEEN und YU, 1982). Hierzu wurde die Säule in Chloroform/Methanol (80:20; v/v) equilibriert, die Probe in 10 ml des gleichen Lösungsmittels aufgetragen und weiter mit 15 ml des Lösungsmittels gewaschen. Eluiert wurde sukzessive mit jeweils 10 ml Chloroform/Methanol in den Volumenverhältnissen 3:1, 2:1 und 1:1.

2.2.2.3 HPLC

2.2.2.3.1 Sialinsäureanalytik (HARA *et al.*, 1989)

Freie Sia müssen vor der HPLC-Analyse mit dem DMB-Reagenz in fluoreszierende 3-Sialo-substituierte 6,7-Methylenedioxy-2(1H)-chinoxalinone überführt werden. Dazu wurde die lyophilisierte Probe in 10 µl 2M Essigsäure und 49 µl des DMB Reagenzes gelöst, gut durchmischt und bei 56 °C für 1 h unter Lichtausschluß derivatisiert. Die Lösung wurde hiernach 5 min bei 14 000 × g zentrifugiert, 5-20 µl der Probe auf einer RP18-Säule mit einem Lösungsmittelgemisch aus Azetonitril, Methanol und aqua bidest (9:7:84; v/v/v) bei einer Flußrate von 1 ml/min isochratisch chromatographiert und die Derivate mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Extinktionswellenlänge von 373 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm detektiert.

Das Reagenz setzte sich zusammen aus 15.6 mg DMB-Dihydrochlorid, das in 523.2 µl Mercaptoethanol, 48 µl 39-prozentiger Natriumhydrogensulfidlösung (w/v) und 9.4 ml aqua bidest gelöst wurde. Diese Lösung wurde bis zum Gebrauch in Aliquots zu je 100 µl bei -26 °C gelagert. Das Detektionslimit lag im hohen Femtomolbereich. Die Menge an Sia, die untersucht wurde, überschritt nicht 3.5 nmol pro aufgetrennter Sialinsäure.

2.2.2.3.2 Gruppentrennung von Gangliosiden (MÜTHING und UNLAND, 1994)

Gereinigte Gangliosidmischungen wurden über diese Anionenaustauschchromatographie in einzelne Gruppen getrennt, die durch die Anzahl von Sia pro Gangliosidmolekül charakterisiert waren. Eine 15 × 1 cm große EMD TMAE 650 (S)-HPLC-Säule wurde durch Waschen mit 40 ml 1 M methanolischem Ammoniumazetat in die Azetatform überführt und anschließend in 40 ml Chloroform/Methanol/bidestilliertem Wasser (30:60:8; v/v/v) equilibriert. Die Flußrate betrug dabei 0.5 ml/min. Die in 500 µl des Equilibrierungslaufmittels gelöste Gangliosidprobe wurde in eine 500 µl Injektionsschleife injiziert und nach folgendem Gradientenschema eluiert:

Zeit (min)	Flußrate (ml/min)	A C/M/W (30:60:8)	B Methanol	C 1 M NH ₄ OAc in Methanol
0	0.5	100	0	0
60	0.5	100	0	0
↓ _{LINEAR}	0.5	↓ _{LINEAR}	↓ _{LINEAR}	0
70	0.5	0	100	0
90	0.5	0	100	0
↓ _{LINEAR}	0.5	0	↓ _{LINEAR}	↓ _{LINEAR}
110	0.5	0	85	15
↓ _{LINEAR}	0.5	0	↓ _{LINEAR}	↓ _{LINEAR}
330	0.5	0	0	100
330	1	0	0	100
370	1	0	0	100

Während der Ammoniumazetatgradientenelution erfolgte die Fraktionierung mit Ausnahme der ersten drei Fraktionen, die je 2.5 ml enthielten, zu je 1.5 ml. Von jeder Fraktion wurden 500 µl in der SpeedVac zweimal getrocknet (der erste Rückstand wurde in 500 µl Chloroform/Methanol aufgenommen) und der so erhaltene Rückstand nochmals in bidestilliertem Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand wurde in 20 µl Chloroform/Methanol (2:1; v/v) gelöst und über Kieselgel 60-HPTLC analysiert (↑ 2.2.2.1.2.1). Nach der Analyse wurden die Fraktionen entsprechend gepoolt.

2.2.3 Sialat-4-O-azetyltransferasetestsysteme

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Enzymtests entwickelt, die dem analytischen Anspruch der Produkte und zugleich dem zeitlichen Aufwand gleichermaßen entgegenkamen.

Ein erwünschenswerter Festphasentest mit präzipitierten Sialoproteinen oder immobilisierten Substraten ist nicht zustande gekommen, weil einerseits keines der getesteten Sialoproteine als annehmbares Substrat zu verwenden gewesen wäre und andererseits Ganglioside als potenteste Substrate wegen des detergenzhaltigen Puffers in immobilisierter Form ausschieden.

2.2.3.1 Erster Enzymtest

Dieser Enzymtest basierte auf der Fällungsreaktion von im Ansatz endogen enthaltenen Akzeptoren. Hierfür wurde ein Homogenat von Golgi-Membranen in aqua bidest, das ungefähr 100 µg Protein in 10 µl enthielt in 190 µl Puffer solubilisiert. Der Puffer enthielt 70 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.7), 90 mM KCl, 2 mM Pefabloc, 2 mM PMSF und 20 mM CHAPS. Wurde nicht CHAPS als Detergenz verwendet, so enthielt der Puffer ein entsprechend anderes Detergenz mit dem Zwei- bis Dreifachen seiner kritischen Mizellarkonzentration. Nach

fünfminütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Probe für 10 min bei $100\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ultrazentrifugiert und der partikelfreie, klare Überstand mit $10\text{ }\mu\text{M}$ [^3H]AcCoA (4.6 kBq) für 30 min bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $400\text{ }\mu\text{l}$ eiskalter PCA gestoppt. Die PCA-Endkonzentration in der gestoppten Lösung betrug dabei 400 Millimol pro Liter. Nach zehnminütigem Kühlen auf Eis wurde die Probe für 10 min bei $14\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, und der Rückstand in $100\text{ }\mu\text{l}$ aqua bidest mit Hilfe eines Ultraschallstabes bei möglichst niedriger Leistung (25 W, 10 % Leistung, 5 s lang) resuspendiert und mit 1 ml eiskaltem aqua bidest vermischt. Nach erneuter Ultrazentrifugation wie schon oben beschrieben, wurde wie nach der ersten Ultrazentrifugation verfahren und der Rückstand ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen resuspendiert und ultrazentrifugiert. Nach Verwerfen des dritten Überstandes, in dem Radiaktivität nur noch in Höhe des natürlichen Hintergrundes festgestellt werden konnte, wurde der Rückstand ein letztes Mal in $200\text{ }\mu\text{l}$ aqua bidest resuspendiert, $50\text{ }\mu\text{l}$ der Suspension alkalisch hydrolysiert und der Rest bei Bedarf auf Sia analysiert. Die alkalische Hydrolyse wurde in $400\text{ }\mu\text{l}$ 1 M Natronlauge für 10 min bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, die Lösung für 5 min auf Eis abgekühlt und das Reaktionsgefäß zwecks Entfernen der an der Deckelwandung haftenden Kondenslösung kurz anzentrifugiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von $200\text{ }\mu\text{l}$ 2 M Salzsäure neutralisiert und $150\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung nach Mischen mit 1 ml Szintillationscocktail im Flüssigszintillationszähler auf Radioaktivität überprüft.

2.2.3.2 Zweiter Enzymtest

Dieser Enzymtest wurde vor allem bei als exogenen Akzeptoren fungierenden Sialosacchariden und freien Sia eingesetzt.

$100\text{ }\mu\text{l}$ Solubilisat, das in etwa $50\text{ }\mu\text{g}$ Protein enthielt, wurden in Gegenwart von $300\text{ }\mu\text{M}$ Akzeptor und $10\text{ }\mu\text{M}$ [^3H]AcCoA (4.6 kBq) für 30 min bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde mit 1 ml eiskaltem aqua bidest verdünnt. Diese Lösung wurde daraufhin direkt auf 1 ml Anionenaustauscherharz Dowex 2×8 , 200-400 mesh, Formiatform in einer $1\text{ cm} \times 1.3\text{ cm}$ dimensionierten Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml aqua bidest gewaschen, mit 10 ml 0.8 M Ameisensäure eluiert und schließlich ein zweites Mal mit 10 ml aqua bidest gewaschen. Das Elutionsvolumen und das zweite Waschvolumen wurden gemeinsam lyophilisiert und mit dreimal $400\text{ }\mu\text{l}$ aqua bidest in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gespült. Nach Trocknung der Lösung in einer Speed Vac-Apparatur wurde der Rückstand in $20\text{ }\mu\text{l}$ aqua bidest gelöst, $5\text{ }\mu\text{l}$ hiervon mit einem ml Szintillationscocktail in einem Flüssigszintillationszähler auf Radioaktivität überprüft und die restlichen $15\text{ }\mu\text{l}$ auf Zelluloseglasdünnenschichtplatten aufgetragen und auf Sia analysiert (vergl. 2.2.2.1.1).

2.2.3.3 Dritter Enzymtest — Erste Variante

100 μ l Solubilisat wurden in Gegenwart von 300 μ M Akzeptor und 6 bis 10 μ M [3 H]AcCoA (4.6 kBq) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde mit 1 ml eiskaltem aqua bidest verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde über 2 ml Volumen fassende Ultrafiltrationseinheiten mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 30 kDa solange unter 5000 \times g-Zentrifugation filtriert, bis der Rückstand 100 μ l betrug. Nach Mischen des Rückstandes mit 1 ml eiskaltem Wasser und erneuter Ultrafiltration wurde der 100 μ l umfassende Rückstand und die beiden vereinten Filtrate jeweils lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden daraufhin in je dreimal 400 μ l eiskaltem Wasser gelöst und einer Sialinsäureanalyse (\uparrow 2.2.2.1.1) zugeführt (Abbildung 7, linke Seite).

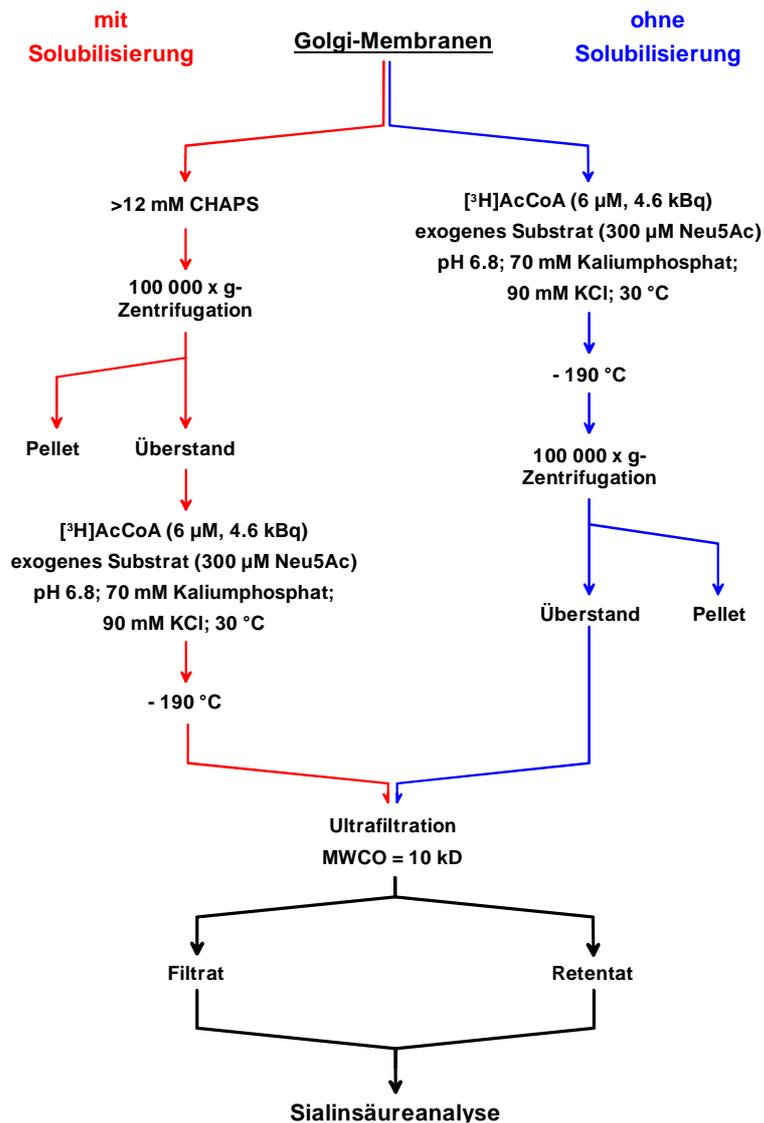


Abbildung 7: Schema von Enzymtest 3

Dieser Enzymtest wurde vorwiegend für exogene Saccharide benutzt, aber auch exogene Proteine, die dann im Ultrafiltrationsrückstand verblieben, konnten nach Abzug der durch endogene Akzeptoren gebildeten Hintergrundaktivität eingesetzt werden. Die **linke Seite** des Schemas präsentiert den Enzymtest für das solubilisierete Enzym (**Variante 1**), die **rechte Seite** die des membrangebundenen Systems (**Variante 2**).

2.2.3.4 Dritter Enzymtest — Zweite Variante

Diese Variante des dritten Enzymtests unterscheidet sich lediglich durch die Verwendung von Golgi-Membranenhomogenat als Enzymquelle anstelle von Golgi-Membranensolubilsat.

Das Homogenat wurde hergestellt, indem das Membranpellet mit 100 μl optimalem detergentenfreiem Puffer überschichtet und mit Hilfe eines Mini-Potter-Homogenisators 5 bis 10 s lang bei Leistungsstufe sieben unter stetiger, sanfter Auf- und Abbewegung resuspendiert wurde. Bis zum Gebrauch verblieb das Homogenat auf Eis.

20 μl Homogenat wurden in 70 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.7), 90 mM KCl, 2 mM Pefabloc und 2 mM PMSF in Gegenwart von 300 μM Akzeptor und min μM [^3H]AcCoA (4.6 kBq) in einem Inkubationsvolumen von 100 μl für 30 min bei 30 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde mit 1 ml eiskaltem aqua bidest verdünnt und zum Abtrennen der Membranen bei 100 000 \times g und 4 °C für 20 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, der Rückstand in 100 μl aqua bidest mit Hilfe eines Ultraschallstabes bei möglichst niedriger Leistung (25 Watt, 10 Prozent Leistung, 5 s lang) resuspendiert und mit 1 ml eiskaltem aqua bidest vermischt. Nach erneuter Ultrazentrifugation wie oben beschrieben, wurde wie nach der ersten Ultrazentrifugation verfahren und der Rückstand ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen resuspendiert und ultrazentrifugiert. Die 3 vereinten Überstände wurden wie unter Variante 1 beschrieben weiter durch Ultrafiltration aufgearbeitet. Der Rückstand konnte wie im ersten Enzymtest beschrieben weiter analysiert werden (Abbildung 7, rechte Seite).

2.2.3.5 Vierter Enzymtest

Einhundert μl , später auch 50 μl Solubilisat wurden in Gegenwart von 150 μM Gangliosid als Akzeptor und 30 μM [^3H]AcCoA (4.6 kBq) für 15 bis 20 min bei 30 °C inkubiert.

Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μl eiskaltem Chloroform/Methanol im Volumenverhältnis 1:2. Die gestoppte Lösung verblieb für 30 min auf Eis, bevor das ausgefällte Protein bei 14 000 \times g und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurde. Der Rückstand wurde verworfen und der Überstand unter Vakuum 1 h lang getrocknet. Der trockene Rückstand wurde in 50 μl Chloroform/Methanol im Volumenverhältnis 1:2 unter starkem Schütteln resuspendiert, bei 14 000 \times g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und 20 μl des Überstandes mit Kieselgeldünnschichtchromatographie für Ganglioside (\uparrow 2.2.2.1.2.1) analysiert. 5 μl des Überstandes wurden mit 1 ml Szintillationscocktail gemischt und im Flüssigszintillationszähler auf Radioaktivität überprüft.

2.2.4 Methoden zur Produktcharakterisierung

2.2.4.1 Alkalische De-*O*-azetylierung (REUTER und SCHAUER, 1994)

In Standardassays durch die solubilisierete 4-OAT azetyliertes Substrat wurde nach Analyse auf Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten in einer Ammoniakatmosphäre über Nacht alkalisch verseift, die DC-Platte ammoniakfrei gefönt und erneut analysiert.

Im Falle einer *O*-Azetylierung würde das radioaktive Label nach der Behandlung nahezu quantitativ verschwunden sein, bei einer *N*-Azetylierung oder einem anderweitigen Einbau in das Kohlenstoffgerüst jedoch erhalten bleiben.

2.2.4.2 Laktosylceramid als exogener Akzeptor

Um festzustellen, ob die im Disialogangliosid gebundenen Sia und nicht der übrige Teil des Moleküls als Azetylgruppenakzeptor fungiert, wurde auch das vollständig desialylierte Produkt, das sogenannte Laktosylceramid auf seine Akzeptorwirkung überprüft.

Enzymtest 4 folgend wurden 150 mM Laktosylceramid mit 15 µl Solubilisat in einem Inkubationsvolumen von 100 µl inkubiert (6.2 µM, [³H]AcCoA, 5.7 kBq). Als Kontrolle diente die Inkubation von 150 mM GD3 unter den exakt gleichen Bedingungen.

2.2.4.3 Inaktivierung des Enzyms durch Hitzedenaturierung

Als Hinweis auf eine enzymatische Reaktion gilt unter anderem auch die irreversible Inaktivierung eines Enzyms. Hierfür wurden 50 µl Solubilisat für 15 min bei 95 °C erhitzt, ausgefallenes Protein nach Abkühlen der Lösung auf Eis durch 10 minütige Zentrifugation bei 14 000 × g entfernt und der Überstand wie unter Enzymtest 4 beschrieben in Gegenwart von 150 µM GD3, sowie 10 µM [³H]AcCoA (5.7 kBq) in einem Volumen von 100 µl inkubiert und analysiert. Als Kontrolle diente die Inkubation von intaktem Solubilisat unter den gleichen Bedingungen.

2.2.4.4 Propionsäurehydrolyse des enzymatisch *O*-azetylierten GD3

Das unter 2.2.4.12 gewonnene Produkt wurde in 500 µl 2 M Propionsäure bei 80 °C für 4 h hydrolysiert, lyophilisiert und der Rückstand nach Derivatisierung mit DMB über HPLC analysiert (↑ 2.2.2.3.1).

2.2.4.5 Behandlung des *O*-azetylierten GD3 durch verschiedene Sialidasen

Drei Sialidasen wurden hierfür verwendet, Sialidase von *Arthrobacter ureafaciens*, von *Vibrio cholerae* und vom Newcastle disease virus. Die Inkubation wurde stets in 100 µl Reaktionspuffer durchgeführt, der 50 mM Natriumazetat (pH 5.5), 65 µM GD3, 5 µM 4-*O*-[³H]Ac-GD3 und im Falle von AUS und VCS 20 mU Sialidase, im Fall von NDVS 10 mU Sialidase ent-

hielt. Für eine optimale Enzymaktivität benötigte VCS zusätzlich 5 mM Kalziumchlorid. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt und lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand wurde dann in 20 µl eiskaltem Wasser gelöst, bei 14 000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und 15 µl des Überstandes wie unter 2.2.2.1.2.1 beschrieben über Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Auswertung geschah über einen TLC-linear analyzer, Primulinfärbung (↑ 2.2.1.3) und Bial-Färbung (↑ 2.2.1.2.1).

2.2.4.6 Co-Chromatographie von durch NDVS behandeltes enzymatisch *O*-azetyliertes GD3 mit Neu4,5Ac₂

Ein weiterer Produktbeweis wurde nach co-chromatographischer Analyse des durch NDVS behandelten Neu4,5Ac₂-GD3 erhalten. Dazu wurden 15 µl des Überstandes aus der Sialidasebehandlung mit 5 µg Neu4,5Ac₂ auf der gleichen Spur aufgetragen und entwickelt. Die Analyse erfolgte anschließend, sukzessive durch TLC-linear analyzer-Auswertung und Bial-Färbung (↑ 2.2.1.2.1).

2.2.4.7 Neu4,5Ac₂ als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT

Neu4,5Ac₂, das nicht als Akzeptor dienen darf, wurde als weiteres Substrat des Enzyms ausgetestet, um die Regioselektivität der *O*-Azetylierungsreaktion zu bestätigen.

Hierzu wurden 15 µl Solubilisat mit 300 µM Neu4,5Ac₂ und 4 µM [³H]AcCoA (8.2 kBq) in einem Inkubationsvolumen von 200 µl inkubiert. Die Durchführung erfolgte, wie unter Enzymtest 2 beschrieben. Zur Kontrolle wurden 300 µM Neu5Ac unter den gleichen Voraussetzungen inkubiert und analysiert.

2.2.4.8 Neu5,9Ac₂ als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT

Im Gegensatz zu Neu4,5Ac₂ sollte Neu5,9Ac₂ als exogenes Substrat der 4-OAT dienen.

Die Inkubation und Analyse erfolgte unter den gleichen, in Abschnitt 2.2.4.7 beschriebenen Bedingungen.

2.2.4.9 Neu5Gc-GM3 als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT

Von dem durch Prof. Dr. Shinsei Gasa zur Verfügung gestellten Gangliosid Neu4Ac5Gc-GM3 wurden 200 µg de-*O*-azetyliert (↑ 2.2.1.14) und ein Teil des entstandenen Neu5Gc-GM3 als exogenes Substrat für die solubilierte 4-OAT genutzt. Enzymtest 4 folgend wurden 45 µl Solubilisat in einem Volumen von 60 µl inkubiert (10 µM [³H]AcCoA, 9.25 kBq, 115 µM Neu5Gc-GM3). Als Kontrolle diente eine Inkubation ohne exogenen Akzeptor.

Die Analyse erfolgte standardmäßig wie unter Enzymtest 4 beschrieben mit der Modifikation, daß auf der gleichen Spur der Dünnschichtplatte 5 µg Neu4Ac5Gc co-chromatographiert und analysiert wurden.

2.2.4.10 Neu4Ac5Gc-GM3 als exogener Akzeptor der solubilisierten 4-OAT

Der gleiche Versuch wie unter 2.2.4.9 beschrieben wurde mit der gleichen Konzentration Neu4AcGc als Substrat durchgeführt.

2.2.4.11 Co-Chromatographie von enzymatisch *O*-azetyliertem GD3 mit Neu5,9Ac₂-GD3

Hierfür wurde Enzymtest 4 folgend (50 µl Solubilisat, 150 µM GD3, 15 µM [³H]AcCoA (5.7 kBq)) tritiummarkiertes 4-*O*-Ac-GD3 biosynthetisiert und analysiert, wobei zusätzlich zur radioaktiven Substanz 5 µg 9-*O*-Ac-GD3 auf die gleiche Spur aufgetragen wurden. Nach Entwicklung und Analyse der Platte durch einen TLC-linear-analyzer und Färbung der silinsäurehaltigen Substanzen durch das Bial-Reagenz wurden beide Auswertungen korreliert.

2.2.4.12 Präparation von enzymatisch *O*-azetyliertem GD3

Es wurden 1100 µl Solubilisat (70 mM Kaliumphosphat (pH 6.7), 90 mM Kaliumchlorid, 2 mM Pefabloc, 150 µl Complete (↑ 2.2.3)) hergestellt, hiervon 100 µl für Kontrollexperimente abgenommen und 1000 µl Solubilisat für 1 h bei 30 °C in 150 µM GD3 und 13 µM AcCoA inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt und jeweils 200 µl der Lösung mit 800 µl Chloroform/Methanol (1:2) kräftig durchmischt und für 1 h bei -20 °C gelagert. Nach 14 000 × g Zentrifugation wurden die Überstände unter Vakuum in einem SpeedVac-concentrator getrocknet. Als Kontrolle werden 100 µl Solubilisat wie unter Enzymtest 4 beschrieben inkubiert und analysiert.

Die nicht radioaktiven, getrockneten Proben wurden in je 50 µl Chloroform/Methanol (1:2) aufgenommen, für 10 min bei 14 000 × g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf eine 10 × 10 cm große Kieselgel 60 HPTLC-Platte aufgetragen. Dabei wurden zwei 3.5 cm breite Bahnen aufgetragen. Unterbrochen waren die beiden Bahnen von einer 1 cm breiten Lücke, in deren Mitte eine 0.5 cm breite Bahn mit 10 µl der radioaktiven Kontrollprobe aufgetragen wurde. Außerdem wurden die nicht radioaktiven Auftragbahnen von ebenfalls 0.5 cm breiten radioaktiven Kontrollbahnen flankiert. Die DC-Platte wurde im Gangliosidlaufmittel entwickelt, getrocknet und die radioaktiven Spuren mit Hilfe eines TLC-linear-analyzers analysiert. Die Bereiche, in denen der radioaktive Produktpeak auftrat, wurden mit einem Bleistift miteinander verbunden und der so markierte nichtradioaktive Bereich mit einem Spatel sehr vorsichtig von der Platte gekratzt. Das so erhaltene Kieselgel wurde in einer mit einer Glasfritte versehenen Glas-

säule mit 20 ml Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8) eluiert (MÜTHING und HEITMANN, 1993), das Eluat an einem Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 5 ml eingengt und der Rückstand nach Zugabe von 50 ml Wasser lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde anschließend in 2 ml Chloroform/Methanol/Wasser (30:60:8, v/v/v) aufgenommen und auf 2 ml DEAE-Sephrose wie unter 2.2.2.2 beschrieben chromatographiert. Das lyophilisierte Produkt wurde anschließend noch über Sepak™-Reversed Phase-Chromatographie gereinigt (↑ 2.2.2.3).

2.2.4.13 Inkubation und anschließende Analyse von Golgi-Membranen mit nicht radioaktivem AcCoA in An- oder Abwesenheit von GD3

Golgi-Membranen einer Golgi-Fraktion wurden in 100 µl Kaliumphosphatpuffer (70 mM, pH 6.7, 90 mM Kaliumchlorid) homogenisiert und davon 50 µl in Gegenwart von 2 mM Pefabloc und 24 µM nicht radioaktivem AcCoA in einem Volumen von 100 µl für 30 min bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden die restlichen 50 µl des Homogenats unter den gleichen Bedingungen, aber ohne AcCoA inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt, die Suspension bei $100\,000 \times g$ und 4 °C für 10 min ultrazentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Das Pellet wurde durch sanfte Ultraschallbehandlung (5s, 25 W, 10 %) in 200 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl 4 M Propionsäure bei 80 °C für 4 h hydrolysiert. Nach Lyophilisation wurden beide Lyophilisationsrückstände in 20 µl 2 M Essigsäure gelöst und nach DMB-Derivatisierung nach der Methode von Hara *et al.* analysiert (↑ 2.2.2.3.1).

2.2.4.14 Inkubation und anschließende Analyse von Solubilisat mit GD3 und nicht radioaktivem AcCoA

Für diese Untersuchung wurden 450 µl Solubilisat in Gegenwart von 50 µM AcCoA und 150 µM GD3 für 2 h bei 30 °C inkubiert. Die auf Eis abgekühlte Lösung wurde über Nacht erschöpfend gegen dreimal 70 ml bidestilliertes Wasser dialysiert und das Retentat nach Lyophilisation in 500 µl 2 M Propionsäure für 4 h bei 80 °C hydrolysiert. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Eis wurde wie schon oben beschrieben dialysiert und das Dialysat lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand wurde daraufhin in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und 10 µl dieser Lösung nach Lyophilisation per RP-HPLC analysiert (↑ 2.2.2.3.1).

Als Kontrolle wurden 450 µl Solubilisat in Gegenwart 50 µM AcCoA jedoch ohne GD3 unter den gleichen Bedingungen inkubiert, aufgearbeitet und analysiert.

2.2.4.15 Unterschiedliche Puffer für die 4-OAT-Reaktion

Da Phosphatpuffer in Hinblick auf eine Anionenaustauschchromatographie des Enzyms schlecht geeignet ist, wurden Enzymtests stattdessen in einem der Sulfonsäurepuffer (Good-Buffer) BES, HEPES, MES und MOPS ausprobiert.

Für diese Untersuchung wurden fünf verschiedene Solubilisate nach bewährter Art bereitet (↑ 2.2.3), mit dem einen Unterschied, daß anstelle des 50 mM Kaliumphosphats als Puffersubstanz 50 mM der oben genannten Puffersubstanzen bei gleichem pH-Wert zum Einsatz kamen. Ein Solubilisat enthielt als Kontrolle herkömmlichen Kaliumphosphatpuffer. Die Inkubationen und Analysen wurden wie unter Enzymtest 4 beschrieben durchgeführt.

2.2.5 Methoden zur Enzymcharakterisierung

2.2.5.1 Solubilisierung von Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen

Die aus der Präparation der Meerschweinchenleber mittels diskontinuierlichem Saccharosegradienten gewonnenen Golgi-Membran-Aliquots wurden gewöhnlicherweise wie folgt solubilisiert: Das Membranpellet wurde mit 100 µl aqua bidest überschichtet und mit Hilfe eines Mini-Potter-Homogenisators 5 bis 10 s lang bei Leistungsstufe sieben unter stetiger, sanfter Auf- und Abbewegung resuspendiert und bis zur Solubilisierung auf Eis gelagert. In 1000 µl Solubilisierungspuffer, der aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5.7), 50 mM KCl, 16 mM CHAPS, 2 mM Pefabloc und 150 µl einer Stammlösung aus einer Tablette Complete-Mini in 1500 µl aqua bidest bestand, wurden 105 µl der Golgi-Membransuspension für 5 min unter kräftigem Schütteln auf einem Eppendorf-Schüttler bei Raumtemperatur solubilisiert. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für 20 min bei $100\,000 \times g$ und 4 °C ultrazentrifugiert und der partikellose, klare Überstand entweder direkt verwendet oder bis zum Gebrauch bei -80 °C eingefroren. Verbliebenes Homogenat und der Rückstand der Ultrazentrifugation wurden für eine Proteinkonzentrationsbestimmung aufgehoben.

Die Herstellung von Solubilisaten für spezielle Untersuchungen sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

2.2.5.2 Sialyltransferasetest

Maximal 100 µg Protein aus Golgi-Membranhomogenat oder anderen Quellen wurden für 4 h bei 37 °C mit 25 µM CMP-[¹⁴C]Neu5Ac (214 Bequerel) in 250 µl 100 mM Kakodylatpuffer (pH 6.5), 0.1 prozentigem BSA, 200 mM Galaktose, 1 mM Neu2en5Ac und 1 mM PMSF inkubiert. Abhängig von dem Experiment waren darüberhinaus 200 µg Asialofetuin und/oder 26 mM Triton X-100 in der Inkubationslösung vorhanden. Die Reaktion wurde durch

15 minütiges Abkühlen auf Eis gestoppt und für 15 min bei $14\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. In $10\ \mu\text{l}$ des Überstandes wurde die Radioaktivität quantitativ bestimmt, $15\ \mu\text{l}$ des Überstandes wurden auf $1\ \text{cm}$ breiten Spuren auf 20 oder $10\ \text{cm}$ langen Zellulosedünnschichtchromatographieplatten aus Glas aufgetragen und in 95% Ethanol/ $0.1\ \text{M}$ Ammoniumazetat im Volumenverhältnis $7:3$ entwickelt. Im Falle der $10\ \text{cm}$ langen Platten wurde die Entwicklung auch mehrmals durchgeführt. Nach dem Trocknen der Platte, wurde die Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte mit einem TLC-linear analyzer bestimmt. Die am Bandenstart verbliebenen Komponenten galten als Maß für das sialylierten Asialofetuin. Alle anderen Komponenten, wie überschüssige CMP-Neu5Ac oder daraus entstandene Neu5Ac migrierten vom Bandenstart fort. Korrelation der so gefundenen Radioaktivität mit der inkubierten Proteinmenge ergaben die spezifische Sialyltransferaseaktivität.

2.2.5.3 Bestimmung der optimalen CHAPS-Konzentration

Die Bestimmung der optimalen CHAPS-Konzentration wurde für verschiedene Substrate (endogen, exogenes Neu5Ac und exogenes GD3) durchgeführt.

2.2.5.3.1 Für endogenes Substrat

Eine Golgi-Membranenfraktion wurde in $100\ \mu\text{l}$ $70\ \text{mM}$ Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH}\ 6.7$, $90\ \text{mM}$ Kaliumchlorid) homogenisiert und $10\ \mu\text{l}$ des Homogenats in $190\ \mu\text{l}$ des gleichen Puffers mit steigenden CHAPS-Konzentrationen (0 , 5.6 , 11.2 , 22.4 , 33.5 und $44.7\ \text{mM}$) solubilisiert, inkubiert und analysiert, wie es unter Enzymtest 1 beschrieben steht.

2.2.5.3.2 Für exogenes Neu5Ac

Von einem Golgi-Membranenhomogenat, das in $110\ \mu\text{l}$ $70\ \text{mM}$ Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH}\ 6.7$, $90\ \text{mM}$ Kaliumchlorid) bereitet worden war, wurden $15\ \mu\text{l}$ in $190\ \mu\text{l}$ des gleichen Puffers mit steigenden CHAPS-Konzentrationen (0 , 7 , 14 , 21 und $28\ \text{mM}$) solubilisiert und der $100\,000 \times g$ Ultrazentrifugationsüberstand anschließend inkubiert und analysiert, wie es unter Enzymtest 2 beschrieben steht.

2.2.5.3.3 Für exogenes GD3

In entsprechender Weise wurde für das exogene Substrat GD3 verfahren, wobei zwölfmal $10\ \mu\text{l}$ Homogenat ($50\ \text{mM}$ Kaliumphosphat ($\text{pH}\ 5.7$), $50\ \text{mM}$ Kaliumchlorid) in $50\ \mu\text{l}$ des gleichen Puffers bei 0 , 4 , 5 , 8 , 10 , 14 , 16 , 18 , 20 , 22 , 25 und $30\ \text{mM}$ CHAPS-Konzentration Enzymtest 4 folgend inkubiert und analysiert wurden.

2.2.5.4 Zeitabhängigkeit der 4-OAT-Reaktion

2.2.5.4.1 Mit endogenem Substrat

2.2.5.4.2 Mit Neu5Ac als Substrat

Enzymtest 2 folgend wurde die Neu4,5Ac₂-Bildung nach 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 60 min verfolgt.

2.2.5.4.3 Mit GD3 als Substrat

Diese Untersuchung wurde mit Enzymtest 4 durchgeführt. Hierzu wurden 14 µg solubiliertes Protein in Fünf- bis Zehnminutenintervallen über maximal 50 min lang inkubiert.

2.2.5.5 Temperaturabhängigkeit der solubilierten 4-OAT

Diese Untersuchung wurde mit Enzymtest 5 durchgeführt. Dabei wurden 30 µg solubiliertes Protein bei jeweils 0, 10, 20, 25, 27, 30, 33, 35, 37, 41 und 55 °C inkubiert.

2.2.5.6 pH-Optimum der solubilierten 4-OAT

Für dieses Experiment wurden 15 150 mM Kaliumphosphatpuffer mit folgenden pH-Werten angesetzt: 4.9, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.1, 6.3, 6.5, 6.7, 6.9, 7.2, 7.4, 7.6, 7.9 und 8.2.

Zehn µg Protein aus Golgi-Membranhomogenat wurden in 70 mM KCl, 16 mM CHAPS, 2 mM Pefabloc, 15 µl Complete-Stammlösung und 70 mM Kaliumphosphatpuffer des jeweiligen pH-Wertes solubiliert. Das Solubilisierungsvolumen betrug 50 µl. Die Mischungen wurden für 5 min kräftig bei Raumtemperatur geschüttelt, ohne Schaum zu erzeugen und für 15 min bei 100 000 × g und 4 °C ultrazentrifugiert. Fünfundvierzig µl des Überstandes wurden daraufhin mit [³H]AcCoA und GD3 für 15 min bei 30 °C inkubiert, wobei die Konzentration von [³H]AcCoA 20 µmol pro Liter mit einer Zerfallsrate von 4.6 kBq betrug. Die Konzentration von GD3 betrug 70 µmol pro Liter. Abstoppen und Analyse erfolgte wie unter Enzymtest 5 beschrieben.

2.2.5.7 Abhängigkeit der solubilierten 4-OAT von der Pufferkonzentration

Fünf µl eines Solubilisats, das mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer und ohne Kaliumchlorid angesetzt worden war, wurden mit so viel einer 100 mM Kaliumphosphatpufferstammlösung (pH 5.7) versetzt, daß die Endkonzentration an Kaliumphosphat in 30 µl 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 85, 95, 105, 115, 125 und 135 µM betrug. Die übrigen Konzentrationen entsprachen denen im Solubilisierungspuffer. Es wurde mit 20 µM [³H]AcCoA (4.6 kBq) und 70 µM GD3 für 15 min bei 30 °C inkubiert und wie unter Enzymtest 5 beschrieben analysiert.

2.2.5.8 Kaliumchloridoptimum der solubilisierten 4-OAT

Für dieses Experiment wurden entsprechende KCl-Mengen lyophilisiert, so daß die KCl-Endkonzentration nach Auflösen des Lyophilisats in 30 µl KCl-freiem Solubilisat 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70 oder 90 Millimol pro Liter betrug. Inkubiert wurde für 15 min bei 30 °C mit 20 µM [³H]AcCoA (4.6 kBq) und 70 µM GD3. Abstoppen und Analyse erfolgte wie unter Enzymtest 5 beschrieben.

2.2.5.9 Reversible Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch hohe Kaliumchloridkonzentration

Um festzustellen, ob die Enzymaktivität nach Lagerung des Enzyms bei hohen KCl-Konzentrationen durch Verdünnen auf die optimale Salzkonzentration wieder herzustellen war, wurde wie folgt verfahren:

In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde soviel KCl lyophilisiert, daß eine 200 mM KCl-Endkonzentration im Inkubationsvolumen von 30 µl erzielt wurde. Der Lyophilisationsrückstand wurde anschließend mit 25 µl KCl-freiem Solubilisat gelöst. Die Proben wurden mit je 80 µl optimalem Puffer, der 200, 150, 100 und 50 mM KCl enthielt, verdünnt, und mit 5 µl [³H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq, Endkonzentration 30 µM) in Gegenwart von GD3 (Endkonzentration 150 µM) inkubiert. Als Kontrollexperiment wurde entsprechend weniger KCl vorgelegt und mit 80 µl optimalem Puffer verdünnt, so daß die Endkonzentration während der Inkubation optimale 50 mmol/l betrug.

Die Inkubation erfolgte über 30 min bei 30 °C und wurde durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Je 20 µl der Probelösungen wurden auf 1 cm breiten Bahnen mit Kieselgel 60-Dünnschichtchromatographie wie unter Enzymtest 5 beschrieben analysiert.

2.2.5.10 Proteinabhängigkeit der solubilisierten 4-OAT

Die Abhängigkeit der Enzymreaktion vom Proteingehalt wurde einerseits für das membran-gebundene System als auch für das solubilisierte Enzym untersucht.

2.2.5.10.1 Das membrangebundene System

Ein Golgi-Membranenpellet wurde in 180 µl 70 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.7, 90 mM Kaliumchlorid) homogenisiert und mit 190 µl desselben Puffer verdünnt. Je 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 µl des Homogenats (1 µg Protein/µl) wurden in 200 µl des Puffer mit 6 µM [³H]AcCoA (1.5 kBq) bei 30 °C für 5 min inkubiert und wie unter Enzymtest 1 beschrieben mit PCA gestoppt und weiter aufgearbeitet.

2.2.5.10.2 Die solubilisierete 4-OAT

Enzymtest 2 folgend wurden 5, 10, 15, 20 und 25 μl Solubilisat (15 μg Protein/ μl) mit 300 μM Neu5Ac und 4 μM AcCoA (8.4 kBq) in einem Volumen von 200 μl inkubiert und entsprechend analysiert.

2.2.5.11 Nachinkubation mit AcCoA

Während der Zeit einer Inkubation mit AcCoA nimmt die AcCoA-Konzentration ab, gleichzeitig nimmt die des Inhibitors CoA zu. Zwei Tatsachen, die gegenseitig eine Abnahme der 4-OAT-Aktivität während der Inkubation beschleunigen können. Wenn das der Fall sein sollte, so könnte mit einer AcCoA-Nachinkubation dieser Effekt aufgehoben werden.

Eine Nachinkubation wurde für die Inkubation der 4-OAT mit den exogenen Substraten Neu5Ac und GD3 durchgeführt. Im Falle des Neu5Ac, welches Enzymtest 3 folgend inkubiert wurde (\uparrow 2.2.3.3), erfolgte nach 15 min die Zugabe von 5 μl optimalem Puffer, der 126 μM [^3H]AcCoA (4.6 kBq) enthielt, so daß sich die AcCoA-Endkonzentration im nun 105 μl umfassenden Inkubationsvolumen mit 12 μM verdoppelt hatte. Das Verhältnis von radioaktivem zu nichtradioaktivem AcCoA wurde hierbei konstant gehalten. Die Inkubation wurde Enzymtest 3 folgend zuende geführt. Für GD3 als exogenem Akzeptor wurde ähnlich verfahren. Nach 5 min Inkubation wurden dem Reaktionsansatz 2 μl 480 μM [^3H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq) in optimalem Puffer zugefügt und über die verbliebene Restinkubationszeit weiter inkubiert. Auch hierbei blieb das Verhältnis von radioaktivem zu nichtradioaktivem AcCoA konstant. Das weitere Prozedere ist Enzymtest 5 zu entnehmen (\uparrow 2.2.3.6).

2.2.5.12 Kinetische Aspekte

2.2.5.12.1 Michaelis-Menten-Kinetik für die Substrate AcCoA, GM3, GD3, GD1a und GD1b

Eine Michaelis-Menten Kinetik bezüglich AcCoA wurde durchgeführt, indem steigende Mengen AcCoA (18 – 708 pmol) in Gegenwart von jeweils 5.5 μg GD3 in Reaktionsgefäßen lyophilisiert und anschließend in je 5 μl [^3H]AcCoA (4.9 pmol, 4.6 kBq) gelöst wurden. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin mit 25 μl , auf 30 °C vortemperiertem Solubilisat für 15 min bei 30 °C inkubiert. Gestoppt und weiter aufgearbeitet wurde wie in Enzymtest 5 beschrieben. Zwei graphische Darstellungen wurden gewählt: Der direkte Auftrag von Umsatz gegen die AcCoA-Molarität und der entsprechend reziproke Auftrag nach Lineweaver und Burk. Bei einer der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchenden Enzymreaktion ergibt sich in der Lineweaver-Burk-Darstellung eine Gerade, die den ersten Quadranten absteigend in Richtung des vierten Quadranten verläßt, wobei der Schnittpunkt der Gerade mit der Abszisse im vierten Quadranten den Kehrwert der apparenten Michaelis-Menten-Konstante ergibt, der Schnittpunkt der Geraden

mit der Ordinate den Kehrwert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit.

Für die Bestimmung derselben Parameter in Bezug auf die Ganglioside GM3, GD3, GD1a und GD1b wurden steigende Mengen des jeweiligen Gangliosids in Reaktionsgefäßen lyophilisiert und mit je 5 µl [³H]AcCoA (900 pmol, 4.6 kBq, in optimalem Puffer (↑ 2.2.3.6)) gelöst, bevor mit 25 µl, auf 30 °C vortemperiertem Solubilisat für 15 min bei 30 °C inkubiert wurde. Gestoppt und weiter aufgearbeitet wurde wiederum wie in Enzymtest 5 beschrieben. Die Auswertung erfolgte analog der zuvor beschriebenen.

Die Konzentration der Ganglioside im Reaktionsansatz lag zwischen 0 und 150 µmol pro Liter.

2.2.5.12.2 Bestimmung der Inhibitionskonstante für CoA

Um eine Inhibitionskonstante zu bestimmen, wird die Enzymreaktion bei steigenden Substratkonzentrationen in Gegenwart konstantgehaltener Inhibitorkonzentrationen betrachtet. Das Substrat war in diesem Fall AcCoA, der Inhibitor CoA. Bei dieser Untersuchung wurde Enzymtest 5 gefolgt. In einer Reaktionsfolge wurden dabei gleiche Mengen Solubilisat mit fünf verschiedenen AcCoA-Konzentrationen inkubiert, denen jeweils die gleiche Menge CoA zugesetzt worden war. Die AcCoA-Konzentrationen betragen hierbei 10, 20, 30 und 40 µmol pro Liter, die vier dabei untersuchten CoA-Konzentrationen betragen 0, 10, 20 und 30 µmol pro Liter. Die Auswertung erfolgte analog der von Lineweaver und Burk in nur einer Darstellung, wobei je nach Art der Hemmung unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden können, weshalb hier auf den Ergebnisteil verwiesen sein soll (↑ 2.2.5.12.2).

2.2.5.13 Weitere Inhibitionsversuche

2.2.5.13.1 Inhibitionsversuch mit 3'-Dephospho-CoA

Der Inhibitor 3'-Dephospho-CoA wurde in vorgegebenen Konzentrationen lyophilisiert, und mit 15 µl einer [³H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq) aufgenommen. Durch Zugabe von 15 µl 30 °C warmen Solubilisats wurde die Reaktion gestartet. Die AcCoA-Konzentration betrug im Reaktionsansatz stets 30 µmol pro Liter, die des 3'-Dephospho-CoA 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 oder 100 µmol/Liter. Die Durchführung des Enzymtests ist unter Enzymtest 5 nachzulesen.

2.2.5.13.2 Inhibitionsversuch mit Desulfo-CoA

Desulfo-CoA wurde ebenfalls in vorgegebenen Konzentrationen lyophilisiert, in der Weise, daß die Konzentration des Inhibitors im Reaktionsansatz 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 oder 200 µmol/Liter betrug. Das Lyophilisat wurde vor der Inkubation mit 30 °C warmen Solubilisat in 5 µl einer [³H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq) aufgenommen. Die AcCoA-Konzentration im Reak-

tionsansatz betrug jeweils 30 $\mu\text{mol/Liter}$. Die Durchführung des Enzymtests ist unter Enzymtest 5 nachzulesen.

2.2.5.13.3 Inhibitionsversuch mit DIDS (4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilbendisulfonsäure)

Der Inhibitionsversuch mit DIDS wurde analog der zuvor beschriebenen Inhibition mit Desulfo-CoA durchgeführt. Die DIDS-Konzentration betrug während der Inkubation 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 oder 300 $\mu\text{mol/Liter}$. Alle anderen Angaben sind dem zuvor beschriebenen Inhibitionsprotokoll zu entnehmen.

2.2.5.13.4 Inhibitionsversuche mit verschiedenen Nukleotiden und anderen Verbindungen

Unter Anwendung von Enzymtest 5 wurden folgende Verbindungen in 1 millimolarer Konzentration auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich der solubilisierten 4-OAT überprüft:

AMP; ATP; 3',5'-ADP; c-AMP; CMP; IMP; IDP; ITP; NAD; NADP; Adenosin; Adenin; Panthothensäure, PLP und *p*-CMB.

Die in Wasser gelösten Substanzen wurden in der entsprechenden Konzentration lyophilisiert, in 15 μl Solubilisat und 10 μl optimalem Puffer aufgenommen und wie beschrieben mit [^3H]AcCoA und GD3 inkubiert und analysiert.

2.2.5.13.5 Inhibitionsversuch mit Laktosylceramid

Um den inhibitorischen Einfluß von Laktosylceramid (Asialo-GD3) zu überprüfen, wurden vier verschiedene Mengen Laktosylceramid zusammen mit gleichen Mengen GD3 lyophilisiert, so daß die Konzentration an Laktosylceramid im Reaktionsansatz 40, 80, 120 oder 140 $\mu\text{mol/Liter}$, die des GD3 80 $\mu\text{mol/Liter}$ betrug. Das Lyophilisat wurde mit je 20 μl Solubilisat aufgenommen und mit 5 μl [^3H]AcCoA (4.6 kBq) inkubiert. Die AcCoA-Konzentration betrug dabei 30 $\mu\text{mol/Liter}$. Weitere Einzelheiten sind Enzymtest 5 zu entnehmen.

2.2.5.13.6 Inhibitionsversuch mit Cibacron-Blue F3G-A

In Hinblick auf den Reinigungsversuch der solubilisierten 4-OAT durch sogenannte Farbstoffsäulen wurde der für nukleotidabhängige, insbesondere CoA-abhängige Enzyme geeignete blaue Farbstoff Cibacron Blue F3G-A in seiner ungebundenen Form als Inhibitor getestet.

Dazu wurden Enzymtest 5 folgend steigende Konzentrationen von lyophilisiertem Farbstoff in je 20 μl Solubilisat mit 5 μl [^3H]AcCoA in Gegenwart von GD3 inkubiert und analysiert. Die Farbstoffkonzentration betrug dabei 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150, 200 und 400 $\mu\text{mol/Liter}$.

2.2.5.14 Stabilitätstests

2.2.5.14.1 Stabilitätstest des membrangebundenen Enzyms bei drei Temperaturen

Ein Meerschweinchenleber-Golgi-Membranpellet wird in 200 μl optimalem Puffer (ohne

CHAPS) homogenisiert und mit weiteren 190 μl desselben Puffers verdünnt.

Dreimal 120 μl dieses Homogenats wurden bei drei verschiedenen Temperaturen (0 °C, 4 °C, 25 °C) gelagert. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h wurden jeweils 15 μl des Homogenats für den Enzymtest mit 175 μl des Puffers verdünnt und mit 15 μl [^3H]AcCoA-Lösung (1.3 kBq, 1.2 nmol) 5 min lang inkubiert. Als Akzeptoren dienten endogen vorhandene Substrate.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μl eiskalter PCA gestoppt. Die PCA-Endkonzentration in der gestoppten Lösung betrug dabei 400 Millimol pro Liter. Nach zehnmütigem Kühlen auf Eis wurde die Probe für 10 min bei $14\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, und der Rückstand in 100 μl aqua bidest mit Hilfe eines Ultraschallstabes bei möglichst niedriger Leistung (25 Watt, 10 Prozent Leistung, 5 s lang) resuspendiert und mit 1 ml eiskaltem aqua bidest vermischt. Nach erneuter Ultrazentrifugation wie schon oben beschrieben, wurde wie nach der ersten Ultrazentrifugation verfahren und der Rückstand ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen resuspendiert und ultrazentrifugiert. Nach Verwerfen des dritten Überstandes, in dem Radioaktivität nur noch in Höhe des natürlichen Hintergrundes festgestellt werden konnte, wurde der Rückstand ein letztes Mal in 200 μl aqua bidest resuspendiert und 50 μl der Suspension alkalisch hydrolysiert. Die alkalische Hydrolyse wurde in 400 μl 1 M Natronlauge für 10 min bei 80 °C durchgeführt, die Lösung für 5 min auf Eis abgekühlt und das Reaktionsgefäß zwecks Entfernen der an der Deckelwandung haftenden Kondenslösung kurz an zentrifugiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von 200 μl 2 M Salzsäure neutralisiert und 150 μl dieser Lösung nach Mischen mit 1 ml Szintillationscocktail im Flüssigszintillationszähler auf Radioaktivität überprüft.

2.2.5.14.2 Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms bei 4 °C

Es wurden 700 μl Solubilisat hergestellt, hiervon (Enzymtest 4 folgend) 90 μl sofort auf 4-OAT-Aktivität überprüft und das übrige Solubilisat bei 4 °C gelagert. Nach 24, 48, 72, 96 und 168 h wurden dem Solubilisat jeweils 90 μl entnommen, die entsprechend der ersten Probe inkubiert wurden. Alle Proben wurden am letzten Entnahmetag gemeinsam analysiert.

2.2.5.14.3 Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms gegenüber Frier-Tau-Zyklen

Hierfür wurden 600 μl Solubilisat in sechs 100 μl -Aliquots aufgeteilt, von denen fünf sogleich bei -80 °C eingefroren wurden. Neunzig μl des verbliebenen Aliquots wurden wie unter Enzymtest 4 beschrieben inkubiert und analysiert. Nach 30 min wurden die eingefrorenen Aliquots bei 30 °C aufgetaut und eines dieser Aliquots wie soeben beschrieben inkubiert, während die verbliebenen vier Proben wieder für 30 min eingefroren wurden. Dieser Vorgang wiederholte sich, bis auch die sechste Probe inkubiert worden war.

2.2.5.14.4 Stabilitätstest des solubilisierten Enzyms gegenüber Lyophilisation

Hierfür wurden 20 µl Solubilisat lyophilisiert und der Rückstand mit 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Enzymtest 5 folgend wurde diese Probe und 20 µl des Originalsolubilisats inkubiert und analysiert.

2.2.5.14.5 Einfluß anderer Substanzen auf die 4-OAT-Aktivität

Weiterhin wurden Substanzen ausgetestet, die Enzympräparationen oftmals als Stabilisatoren zugesetzt werden (VON JAGOW *et al.*, 1994). Es handelte sich dabei um Glycerin, Saccharose, DTT, 2-Mercaptoethanol und 2-Mercaptoethanolamin. Außerdem wurde EDTA eingesetzt, um die Abhängigkeit der Enzymaktivität von zwei- und dreiwertigen Metallkationen zu überprüfen. Dem Experiment lag Enzymtest 3 oder Enzymtest 5 zugrunde. DTT, 2-Mercaptoethanol und 2-Mercaptoethanolamin wurden in einer 2 mM, EDTA in 1 mM und Saccharose in 200 mM Konzentration eingesetzt. Glycerin lag im Inkubationsansatz 14 %-ig (w/v) vor. Die Inkubationsbedingungen und Analyseverfahren sind den entsprechenden Enzymtestprotokollen zu entnehmen.

2.2.5.15 Ultrafiltrierfähigkeit der solubilisierten 4-OAT

Für diese Experimente wurden 500 µl Solubilisat in Centrex UF-0.5-Einheiten mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 30 kDa so lange bei $9000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert, bis etwa 50 µl Rückstand verblieben. Das Filtrat wurde gesammelt, der Rückstand mit 450 µl optimalem Puffer durchmischt und erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. In Wiederholungsexperimenten wurde auch 1 ml Solubilisat über Centrex UF-2.5-Einheiten bei $3500 \times g$ zentrifugiert, bis das Rückstandsvolumen etwa 100 µl betrug. Das Filtrat wurde gesammelt und der Rückstand mit 2 ml optimalem Puffer durchmischt. Nach einer zweiten Ultrafiltration wurden die 100 µl Ultrafiltrationsrückstand als Enzymquelle verwendet.

Zur Überprüfung noch vorhandener Enzymaktivität wurden entweder 20 µl Filtrat, 2 µl des mit 18 µl optimalen Puffer vermischten Filtrationsrückstandes oder 2 µl des mit 18 µl Ultrafiltrat vermischten Filtrationsrückstandes in Gegenwart von 150 µM GD3 und 30 µM [³H]AcCoA (4.6 kBq) wie unter Enzymtest 5 beschrieben inkubiert und weiter ausgewertet. Als Kontrolle diente die Inkubation von 20 µl des Solubilisats unter den gleichen Bedingungen.

Für weitere Kombinationsexperimente wurden die eben beschriebenen Versuche jeweils mit hitzeinaktiviertem Ultrafiltrat oder Ultrafiltrationsrückstand oder Solubilisat durchgeführt. Die Hitzeinaktivierung geschah durch 15 minütiges Erhitzen auf 95 °C.

2.2.5.16 Co-Faktor-Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion

Für dieses Experiment wurden 300 µl 30 kDa-Ultrafiltrat aus 500 µl Solubilisat gewon-

nen (\uparrow 2.2.5.15) und über SeppakTM-Chromatographie in hydrophile und hydrophobe Bestandteile getrennt. Dazu wurde das Chromatographiematerials in einer 0.6×1 cm großen Säule mit 3 ml Chloroform/Methanol (2:1; v/v), 2 ml Chloroform/Methanol (1:1; v/v), 3 ml Methanol und schließlich mit 10 ml entgastem bidestilliertem Wasser equilibriert.

Die 300 μ l Ultrafiltrat wurden mit 1200 μ l entgastem, bidestilliertem Wasser verdünnt und auf die Säule aufgetragen, die anschließend mit 10 ml entgastem bidestilliertem Wasser gewaschen wurde. Das hierbei erhaltene Eluat enthielt die hydrophilen Bestandteile und wurde lyophilisiert. Die hydrophoben Bestandteile wurden eluiert, indem die Säule in Bezug auf die Equilibrierung umgekehrten Reihenfolge behandelt, also erst mit 3 ml Methanol, 2 ml Chloroform/Methanol (1:1; v/v) und 3 ml Chloroform/Methanol (2:1; v/v) eluiert wurde. Um sicher zu gehen, alle hydrophoben Bestandteile zu eluieren, wurde noch zusätzlich mit 2 ml Chloroform eluiert. Die vereinten Phasen der hydrophoben Elution wurden am Rotationsverdampfer auf 2 ml eingeeengt und der Rückstand nach Zugabe von 50 ml bidestilliertem Wasser lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand des wäßrigen Eluats wurde in 3×500 μ l bidestilliertem Wasser gelöst und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß nochmals lyophilisiert. Der Lyophilisationsrückstand des hydrophoben Eluats wurde in 500 μ l Methanol und 2×500 μ l Chloroform/Methanol (8:2; v/v) gelöst und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit einem Speed Vac-concentrator getrocknet. Beide Rückstände wurden in je 150 μ l optimalem Solubilisationspuffer aufgenommen.

Um festzustellen, in welchem der Eluate sich der Co-Faktor befand, wurden je 2 μ l des aus dem Ursprungsolubilisat erhaltenen 30 kDa-Rückstands mit entweder 18 μ l des hydrophilen oder aber 18 μ l des hydrophoben Eluats und zusätzlich 5 μ l [³H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq) in Gegenwart von GD3 inkubiert. Die AcCoA-Konzentration im Reaktionsansatz betrug dabei 30 μ mol/Liter, die des GD3 150 μ mol/Liter. Als Kontrolle diente die Inkubation von 20 μ l des Ursprungsolubilisats unter gleichen Bedingungen. Weitere Inkubationsparameter sind Enzymtest 5 zu entnehmen.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der solubiliserten 4-OAT von der Co-Faktorkonzentration wurden jeweils 3 ml des ursprünglichen Ultrafiltrationsrückstandes mit steigenden Volumina der Lösung des wäßrigen Eluats und 5 μ l einer [³H]AcCoA-Lösung (4.6 kBq) in Gegenwart von GD3 inkubiert. Um stets in dem gleichen Inkubationsvolumen von 25 μ l zu arbeiten, wurde die fehlende Differenz durch Zugabe von optimalem Puffer ausgeglichen. Dieses Inkubationsexperiment wurde nach der Vorschrift Enzymtests 5 durchgeführt.

2.2.5.17 Test auf Anwesenheit des Co-Faktors in Meerschweinchenleberhomogenatsüberstand und –serum

Als eine einfache Quelle für den Co-Faktor würden sich Meerschweinchenleber und –serum anbieten. Um festzustellen, ob sich Leber und Serum als Co-Faktorquelle eignen, wurde wie folgt verfahren:

Wie unter 2.2.5.15 beschrieben, wurden aus solubilisertem Enzym Ultrafiltrationsrückstand und Ultrafiltrat hergestellt. Einhundert μl Leberhomogenat und 100 μl Serum wurden zudem mit 300 μl Wasser verdünnt, für 15 min bei 95 °C erhitzt und das ausgefallene Protein durch 15-minütige Zentrifugation bei 14 000 \times g abgetrennt. Der Überstand wird abpipettiert, lyophilisiert und der Lyophilisationsrückstand mit 30 μl optimalem Puffer gelöst. Je 18 μl dieser Lösung wurden als Co-Faktorlösung getestet.

Dazu wurden, Enzymtest 5 folgend, 7 μl des 30 kDa-Ultrafiltrationsrückstandes entweder mit 18 μl der aus Meerschweinchenleber oder –serum gewonnenen Lösung oder mit 18 μl 30 kDa-Ultrafiltrat oder mit 18 μl optimalem Puffer inkubiert. Als Kontrollen wurde einerseits das Ultrafiltrat allein andererseits 25 μl des Ursprungssolubilisat unter analogen Bedingungen getestet.

2.2.5.18 Lipide, Neutralsaccharide, Metallionen und andere Substanzen als potentielle Co-Faktoren

Folgende Substanzen wurden in 1 mM Konzentration als potentielle Co-Faktoren getestet:

Lipide : Laktosylceramid, Phosphatidylcholin (Lecithin), neo-Glykolipid (Abbildung 16), Meerschweinchenleberrohextrakt (\uparrow 2.2.1.7),

Neutralsaccharide : Arabinose, *N*-Azetylglukosamin, Fruktose, Glukose, Galaktose, Laktose, Laktulose, Mannose, Saccharose,

Metallkationen aus : CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$,

Nukleotide : AMP, ATP, c-AMP, CMP, IMP, IDP, ITP, NAD, NADP,

sowie das Nukleosid Adenosin, die Nukleotidbase Adenin und das in biochemischen Prozessen häufig auftretende Co-Substrat PLP.

Die in Wasser gelösten Substanzen wurden in entsprechender Menge lyophilisiert, mit je 10 μl 30 kDa-Ultrafiltrationsrückstand, sowie 10 μl optimalem Puffer aufgenommen und Enzymtest 5 folgend mit 5 μl [^3H]AcCoA-Lösung und GD3 inkubiert und analysiert. Als Kontrolle diente die Inkubation von 10 μl 30 kDa-Ultrafiltrationsrückstand mit 10 μl des entsprechenden 30 kDa-Ultrafiltrats.

2.2.5.19 Versuche der Enzymreinigung

Alle Chromatographien wurden bei 4 °C durchgeführt.

Es wurden drei Chromatographien zur Reinigung der 4-OAT ausprobiert. Die Triazinfarbstoffmatrix Cibacron Blue-F3G-A-Agarose, der starke Kationenaustauscher S-Sepharose und die Affinitätsmatrix CoA-Agarose.

2.2.5.19.1 Cibacron Blue F3G-A-Chromatographie

Diese Chromatographie wurde stellvertretend für die in Enzymreinigungen oftmals verwendeten Triazinfarbstoffsäulen durchgeführt. Da die obengenannte Farbstoffsäule unter anderem für CoA-abhängige Enzyme empfohlen wird (LOWE und PEARSON, 1984; STELLWAGEN, 1990), kam diese Matrix zum Einsatz. Das Säulenvolumen betrug bei einem Säulendurchmesser von 0.5 cm 1.5 ml. Equilibriert wurde die Säule in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5.6), der 14 mM CHAPS enthielt. Ein 30 kDa Ultrafiltrationsrückstand des in dem Equilibrierungspuffer angesetzten Solubilisats der 4-OAT (ca. 900 µg Gesamtprotein) wurde in einem Volumen von 0.4 ml bei einer Flußrate von 0.1 ml/min auf die Säule aufgetragen, mit dem gleichen Volumen Puffer nachgewaschen und die Säule für 30 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte Elution mit dem Equilibrierungspuffer bei einer Flußrate von 0.5 ml/min, wobei eluiertes Protein durch Absorptionmessung bei 280 nm detektiert wurde. Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen gesammelt, jede Fraktion über 30 kDa-Ultrafiltration auf optimale Pufferbedingungen gebracht und auf etwa 100 µl aufkonzentriert. Von dieser konzentrierten Lösung wurden jeweils 5 µl mit 15 µl 30 kDa Solubilisierungsfiltrat unter optimalen Bedingungen Enzymtest 5 folgend inkubiert und analysiert.

2.2.5.19.2 Kationenaustauschchromatographie mit S-Sepharose

S-Sepharose wurde wie vom Hersteller empfohlen in seine Kaliumform gebracht und in einer 0.5 × 7 cm großen Säule mit 10 Säulenvolumen Auftragspuffer (20 mM Kaliumphosphat (pH 5.7), 14 mM CHAPS) equilibriert. In diesem Auftragspuffer solubilisierte Golgi-Membranen wurden vor der Chromatographie 30 kDa-ultrafiltriert und der Rückstand in einem Volumen von 500 µl bei einer Flußrate von 0.1 ml/min auf die Säule aufgetragen, mit dem gleichen Volumen Puffer nachgespült und anschließend bei einer Flußrate von 0.5 ml/min weiterchromatographiert. Die Detektion des eluierten Proteins geschah wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Ungebundenes Protein wurde gepoolt und gebundenes Protein im Batch-Verfahren sukzessive eluiert. Es wurde dabei 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 14 mM CHAPS, der zuerst 50, dann 200 und schließlich 500 mM Kaliumchlorid enthielt, verwendet. Die durch das Batchen eluierten Proteine wurden in ersten Orientierungsexperimenten gepoolt, durch 30 kDa-Ultrafiltration wenn notwendig auf optimale Enzymbedingungen eingestellt und auf etwa 150-200 µl eingengt. 10 µl

des Rückstandes wurden zum Schluß mit 10 µl eines unter optimalen Bedingungen gewonnenen 30 kDa-Ultrafiltrats eines Solubilisats Enzymtest 5 folgend inkubiert und analysiert. In späteren Experimenten wurde das die Enzymaktivität enthaltende Eluat in 500 µl Fraktionen gesammelt und wie im vorherigen Abschnitt behandelt.

2.2.5.19.3 CoA-Agarose-Chromatographie

In einer 0.5 × 7 cm großen Säule wurde Co-Agarose in optimalem Puffer mit dem zehnfachen Säulenvolumen equilibriert und 500 µl eines unter optimalen Bedingungen angesetzten und 30 kDa-ultrafiltrierten Solubilisats (ca. 400 µg Protein) bei einer Flußrate von 0.1 ml/min aufgetragen. Nach dem Spülen mit 500 µl optimalem Puffer wurde bei einer Flußrate von 0.5 ml/min chromatographiert. Die Detektion des eluierten Proteins geschah wie zuvor beschrieben. An die Säule nicht bindendes Protein wurde gepoolt und nach durch 30 kDa-Ultrafiltration durchgeführte Konzentrierung auf 150-200 µl wie oben beschrieben auf 4-OAT Aktivität untersucht. Die weitere Elution des an die Matrix gebundenen Proteins wurde wie im vorhergehenden Abschnitt durch Batch-Verfahren eingeleitet. Dabei wurden erneut die 200 und 500 mM Kaliumchlorid enthaltenden Puffer der S-Sepharose-Chromatographie benutzt. Protein enthaltende Eluate wurden in 500 µl Fraktionen gesammelt und in der bekannten Art und Weise aufgearbeitet (↑ 2.2.3.6).

2.2.5.20 Proteinanalysen durch Natriumdodekylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen insbesondere bei Fortschritten in der Proteinreinigung dient die Polyacrylamidgelelektrophorese. Der Nachteil der hohen Toxizität der Acrylamidmonomeren wird mehr als kompensiert durch die chemische Inertheit der Gele, den je nach Vernetzungsgrad variablen Trenngrad der Gele, die gute Lagerungsfähigkeit der Gele und die gute Eignung für mannigfache Färbemethoden. Allerdings ist die Proteinanalyse von Molekülen größer als 800 kDa nicht möglich.

SDS-PAGE Gele wurden in leicht modifizierter Weise nach Laemmli durchgeführt (LAEMMLI, 1970). Verwendet wurde das *Mini-Protean II*-System der Firma Bio Rad (München). Die Gele waren allesamt 0.75 mm dick und bestanden aus einem etwa 1 cm breiten Sammelgel und dem 6 cm breiten Trenngel.

Folgende Stammlösungen wurden stets bereitgehalten:

Für die Gelpräparation von zwei Gelen:

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	: wäßrige Acrylamidlösung (30 %; w/v) mit 0.8 % Bisacrylamid (w/v).
Trenngelpuffer (vierfach konzentriert)	: 1.5 M Tris/HCl, pH 8.7
Sammelgelpuffer (vierfach konzentriert)	: 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
SDS-Lösung	: 10 % (w/v) in bidestilliertem Wasser
APS-Lösung	: 10 % (w/v) in bidestilliertem Wasser
TEMED	: 100 %

Für die Elektrophorese:

Probenpuffer (fünffach konzentriert):	63 mM Tris/HCl (pH 6.8); 0.25 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; ± 3.8 % (w/v) DTT.
Elektrophoresepuffer	: 5 mM Tris; 40 mM Glycin; 0.02 % (w/v) SDS
Molekulargewichtsstandard	: 1 µl Originallösung pro Analyse per Silberfärbung

Um die Gele zu präparieren, wurden folgende Volumina zusammenpipettiert:

	Sammelgel		Trenngel	
	4 %	8 %	8 %	12 %
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (ml)	0.65	2.68	2.68	3.96
Sammelgelpuffer (ml)	1.25	∅	∅	∅
Trenngelpuffer (ml)	∅	2.5	2.5	2.5
Bidestilliertes Wasser (ml)	3	4.61	4.61	3.33
SDS (µl)	50	100	100	100
APS (µl)	50	100	100	100
TEMED (µl)	2.5	7.5	7.5	7.5

Die Prozentangaben (w/v) beziehen sich auf den Poyacrylamidgehalt in der Lösung.

Die vermischten Bestandteile wurden vorsichtig in die laut Herstellerangaben zusammengesetzte Gelelektrophoresekammer pipettiert. Begonnen wurde mit dem Trenngel, das etwa 2 cm unter dem Oberrand des fertigen Gels enden sollte. Nach 30- bis 40-minütiger Polymerisation bei Raumtemperatur, wurden mit dem Sammelgel die verbliebenen 2 cm aufgefüllt, der Kamm zum Ausbilden der Probenauftragstaschen vorsichtig eingesetzt und eventuell unausgefüllte Räume mit Sammelgel aufgefüllt. Nach 30 bis 40 min konnte der Kamm langsam entfernt und die Probestaschen mit Elektrophoresepuffer gespült werden.

Zur Probenbereitung wurden die Proben und Molekulargewichtsstandards mit dem Probenpuffer im Volumenverhältnis 4:1 gemischt und für 3 min bei 70 °C erhitzt. Das Endvolumen betrug 20 µl. Die Proben wurden vor dem Auftragen wenige Sekunden bei 14 000 × g zentrifugiert und mit einer 25 µl Hamilton-Spritze vorsichtig in die mit Elektrophoresepuffer gefüllten Probenaschen des Gels gegeben. Auf ein Gel konnten zehn Proben aufgetragen werden, von denen zumindest eine ein Molekulargewichtsstandard war.

Für die Elektrophorese wurden die Gelkammern in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingehängt und unter den Gelen befindliche Luftblasen durch Spülen mit Elektrophoresepuffer beseitigt. Die Apparatur wurde geschlossen und nach Verbindung mit dem Transformator bei 30 mA und einer maximalen Spannung von 200 V entwickelt. Nach etwa 60 bis 90 min war die Elektrophorese, ersichtlich durch das im Probenpuffer enthaltene und die Front markierende Bromphenolblau, beendet. Das entwickelte Gel wurde aus der Gelkammer herausgelöst und anschließend gefärbt (↑ 2.2.5.20.1).

2.2.5.20.1 Silberfärbung von Polyakrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Heukeshoven und Dernik mit Silber gefärbt (HEUKESHOVEN und DERNIK, 1986). Die Methode beruht darauf, die im Gel fixierten Proteine mit elementarem Silber anzufärben. Dabei werden die am Protein durch ionische Wechselwirkung bindenden Silberionen zum Teil zu ersten Silberkeimen reduziert. Nachdem überschüssiges Silber fortgewaschen wurde, wird das Redoxpotential durch basische Pufferlösung so verschoben, daß die Reduktion der restlichen Silberionen durch Formaldehyd (bevorzugt an den Silberkeimen) eingeleitet wird. Die Reduktion wird anschließend entweder durch Ansäuern oder Zugabe einer EDTA-Lösung gestoppt. Dieses Färbeverfahren ist etwa 20 bis 100 mal empfindlicher als die herkömmliche Coomassie-Färbung. Allerdings ist eine Färbung mit Silber irreversibel.

Folgende wäßrige Lösungen wurden für das Färbeverfahren benötigt:

In LÖSUNG A waren auf 100 ml enthalten	: 0.5 M Natriumazetat 8 mM Natriumthiosulfat 50 mM Glutardialdehyd 30 ml Ethanol
LÖSUNG B	: 6 mM Silbernitrat 7 mM Formaldehyd
LÖSUNG C	: 235 mM Natriumkarbonat 3.5 mM Formaldehyd
LÖSUNG D	: 50 mM EDTA/Natriumhydroxid (pH 8.0)

Bis auf Lösung B waren alle Lösungen lagerfähig. Lösung B mußte jeweils frisch angesetzt werden. Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel direkt nach der Elektrophorese zuerst für 1 bis 2 h in eine wäßrige Lösung aus 30 % Ethanol (v/v) und 10 % Essigsäure und anschließend für mindestens 1 h in Lösung A sanft geschwenkt. Nach dreimaligem, zehnminütigem Waschen des Gels in bidestilliertem Wasser erfolgte die 15- bis 60-minütige Behandlung mit Lösung B. Das Gel wurde zweimal mit bidestilliertem Wasser und einmal kurz mit wenig Lösung C gewaschen, bevor sich das Gel in Lösung C entwickelte. Sobald die gewünschte Färbung erreicht worden war, mußte für 10 min unter Schwenken mit Lösung D gestoppt und schließlich dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen werden. Die Aufbewahrung des Gels erfolgte in bidestilliertem Wasser.

3 Versuchsergebnisse

3.1 Isolierung intakter Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen

Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen erhielt man aus frischer Meerschweinchenleber durch diskontinuierliche Saccharosedichtegradientenzentrifugation (\uparrow 2.2.1.10). Diese Art der Präparation wurde einer Differentialzentrifugation vorgezogen, da schon nach einem einzigen Zentrifugationsschritt die Golgi-Membranen hoch angereichert waren. Es schließt sich lediglich ein kurzer Waschschrift an. Auf diese Weise konnte eine 40 g schwere Leber in zwei Gradientenläufen aufgearbeitet werden. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, eignete sich diese Methode nicht zur Präparation anderer subzellulärer Fraktionen, da aufgrund des stets durch Leberhomogenat überladenen Gradienten in anderen Bereichen keine eindeutigen Fraktionen erhalten werden konnten. Lediglich an der 0.8 M/1.2 M Saccharosegrenzschicht wurden die Golgi-Membranen sehr gut von allen anderen Zellbestandteilen abgetrennt.

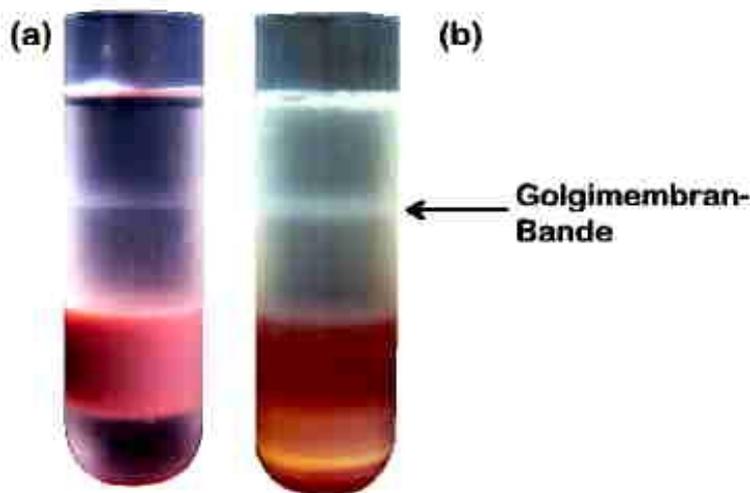


Abbildung 9:

Geschichtete Saccharosedichtegradienten vor und nach der Zentrifugation

Einzig die Golgi-Membranen wanderten unter den Bedingungen der Zentrifugation im Dichtegradienten aufwärts und sammelten sich als milchig trübe Bande an der 1.2/0.8 M Saccharose-Dichtegrenze. Es ist gut zu erkennen, daß es im übrigen Bereich des Gradienten zu keiner weiteren selektiven Auftrennung von Zellbestandteilen kam.

Auch die Messung der spezifischen Sialyltransferaseaktivität als Golgi-Membran-Markerenzym spiegelt diese Beobachtung wider, da lediglich an der eben beschriebenen Grenzschicht eine signifikante spezifische Sialyltransferaseaktivität gemessen werden konnte (Abbildung 10). Morphologisch wurden die präparierten Membranen durch Elektronenmikroskopie untersucht, wobei die Membranstruktur eindeutig zu erkennen war. Eine natürliche Formation, wie sie in der ursprünglichen Leberzelle zu finden ist, war nicht mehr festzustellen. Stattdessen war ein Zusammenschluß zu höheren Aggregaten zu beobachten, aber auch das Entstehen von Membranfragmenten (Abbildung 11).

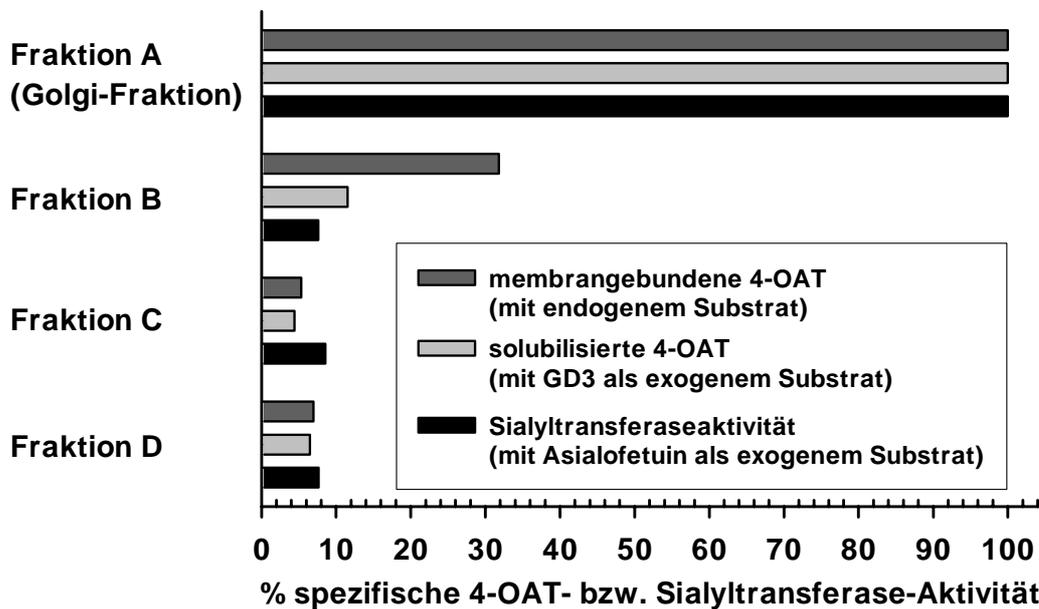


Abbildung 10: Test der vier Saccharosegradienten-Fractionen auf Sialyl- und 4-OAT-Aktivität

Eindeutig sind Sialyltransferaseaktivität und sowohl membrangebundene, als auch solubilierte 4-OAT-Aktivität in der Golgi-Membran-Fraktion co-lokalisiert. Nur ein vernachlässigbarer Anteil ist in den anderen Fraktionen zu finden. Es wurde die höchste spezifische Aktivität als 100 % definiert und die anderen spezifischen Aktivitäten hierzu in Relation gesetzt.

Eine unspezifische (mit MuAc gemessene, ↑ 2.2.1.14.1) als auch spezifische (mit Neu4,5Ac₂ gemessene, ↑ 2.2.1.14.2) OAE-Aktivität konnte weder in Golgi-Membranen noch im Golgi-Membranensolubilisat festgestellt werden. Da jede Golgi-Membranenpräparation trotzdem unterschiedlich ausfallen konnte, wurde bei der Solubilisierung nicht auf den Einsatz von Esteraseinhibitoren verzichtet. Jeder Ansatz enthielt stets 1 mM Pefabloc (↑ 2.2.3).

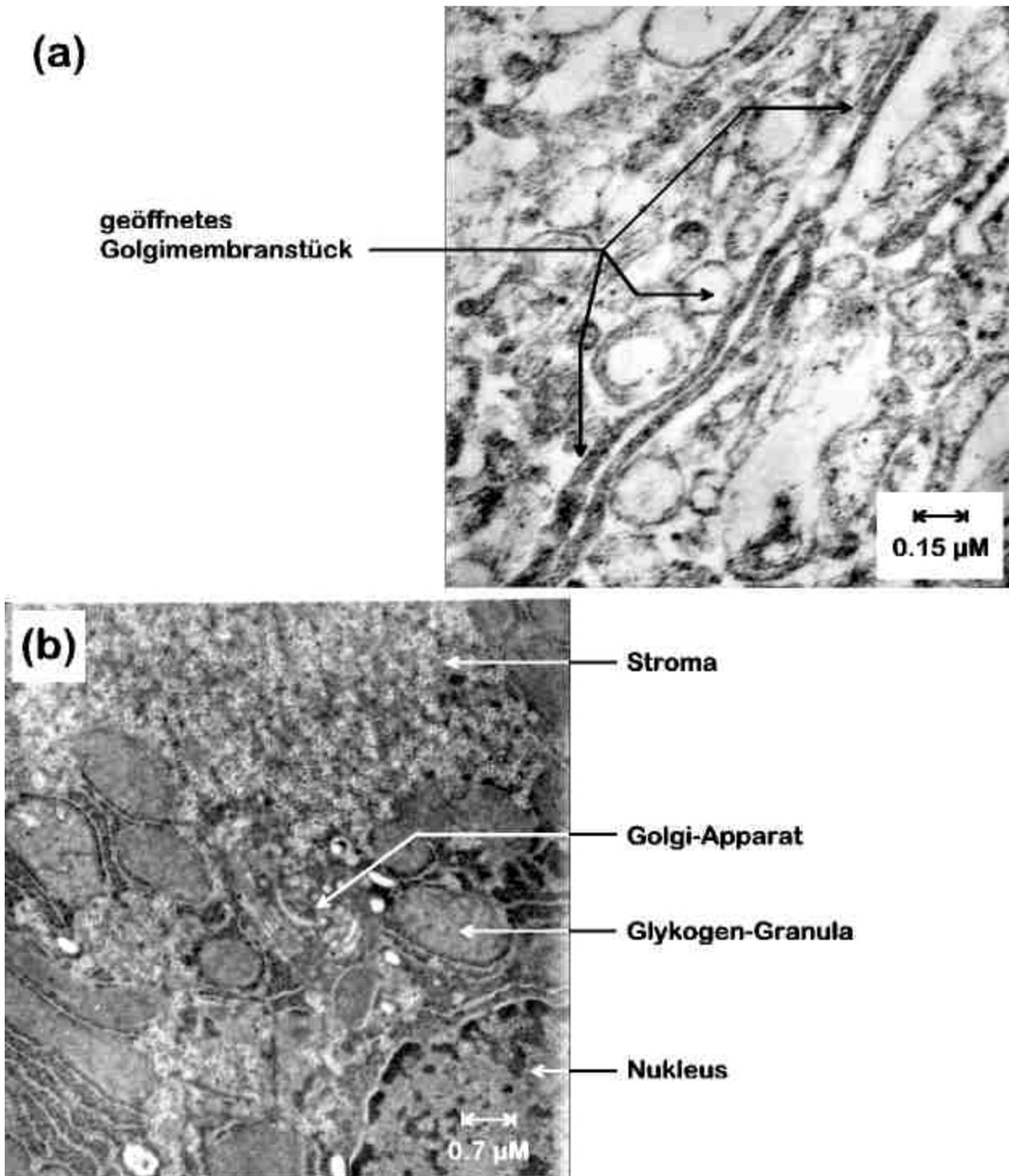


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Aufnahmen wurden von

- (a) pelletierten Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen und
- (b) Meerschweinchenleberzellen gemacht.

In (a) ist deutlich zu erkennen, daß die Membranen auch zerrissen sein können, weswegen Substrate nun auch zum membrangebundenen Enzym Zugang haben. In (b) sieht man einen unversehrten Hepatozyten. Die einzelnen Bestandteile sind indiziert. Die Golgi-Membranen wurden nach Zerreiben der Zellen in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert.

3.2 Solubilisierung der 4-OAT

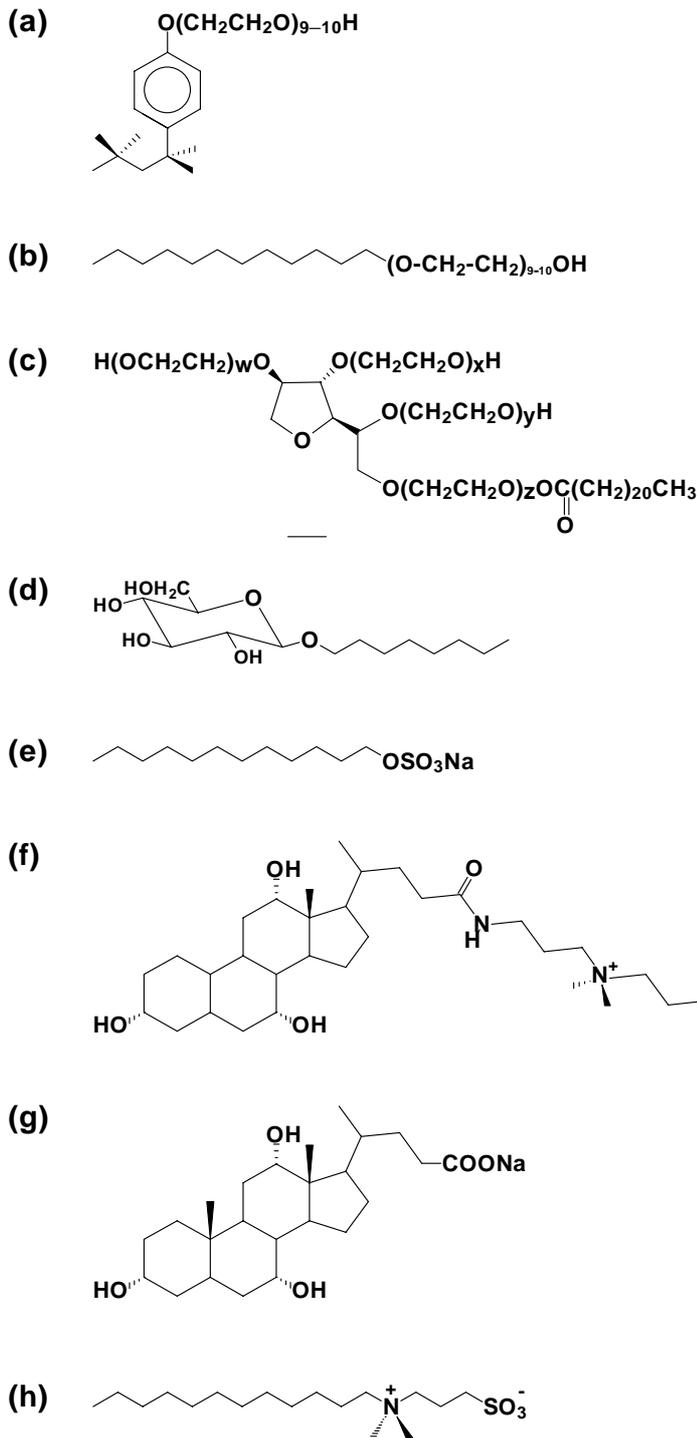


Abbildung 12:

Detergenzien, die für Solubilisierungsversuche eingesetzt wurden.

- (a) Triton X-100
- (b) Lubrol-PX
- (c) TWEEN 20 ($w+x+y+z = 20$)
- (d) *n*-Oktyl- β -D-glukopyranosid
- (e) SDS
- (f) CHAPS
- (g) Natriumchololat
- (h) Zwittergent 3-12

3.2.1 Wahl des geeigneten Detergenzes

Da die 4-OAT aus Meerschweinchenleber membranständig im Golgi-Apparat lokalisiert ist (IWERSEN *et al.*, 1998), war der erste Schritt auf dem Weg zur Reinigung dieses Enzyms sein Ablösen von der Membran. Zwei Alternativen standen hier grundsätzlich zur Verfügung. Wenn bekannt ist, wie das Enzym in der Membran verankert ist, kann versucht werden, das

Enzym ohne den Membrananker durch geeignete Enzyme von der Membran abzuspalten. Oder man versucht, ein geeignetes Detergenz zu finden, welches die Membran mitsamt der Membranproteine solubilisiert, ohne dabei im Idealfall die Enzymaktivität zu beeinträchtigen.

Die enzymatische Ablösung des aktiven Enzyms ohne den Membrananker ist schonender, unter der Voraussetzungen, die Zugänglichkeit des membranständigen Enzyms oder die Reaktionsbedingungen für das spaltende Enzym setzen keine Grenzen. Ob das abgelöste Enzym ohne seinen Membranteil überhaupt funktionsfähig und stabil bleibt, ist ein weiterer Diskussionspunkt. Der Ansatz, membrangebundene Enzyme über ein Detergenz zu solubilisieren ist weit verbreitet, weil diese Methode allgemein anwendbar und vor allen Dingen die kostengünstigere ist. Nachteile sind der oftmals beobachtete Verlust an Enzymaktivität und das schwerwiegende Problem, die Detergenzien schließlich wieder zu entfernen, wobei ohne Detergenz die Enzymaktivität manchmal nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

Auch im Fall der Reinigung der 4-OAT wurde versucht, das Enzym mit Hilfe von Detergenzien zu solubilisieren. Die Detergenzien, die hierbei Verwendung fanden und nichtionischen, anionischen oder zwitterionischen Ursprungs waren, sind in Abbildung 12 gezeigt. Die Detergenzien CHAPS, Lubrol-PX, Natriumdesoxycholat, *n*-Oktyl- β -D-glukopyranosid, Triton X-100 und Zwittergent 3-12 finden für die Solubilisierung nativer Membranproteine häufig Verwendung (NEUGEBAUER, 1990). Alle Detergenzien wurden mit dem zwei- bis dreifachen Wert ihrer kritischen Mizellarkonzentration (CMC) eingesetzt.

In Anlehnung an den Enzymtest, der für die Charakterisierung des membrangebundenen Systems herangezogen wurde und auf der Ausfällung von endogenen Akzeptorproteinen beruhte, wurde das gewonnene Golgi-Membransolubilisat (\uparrow 2.2.3) unter den für das membrangebundene System bekannten optimalen Inkubationsbedingungen inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von PCA ausgefällt, gewaschen und die inkorporierte Radioaktivität quantifiziert.

Das einzige der benutzten Detergenzien, welches bei Durchführung dieses Enzymtests in der Lage war, einen signifikanten Einbau an radioaktivem Azetat aus AcCoA zu unterstützen, war das zwitterionische Detergenz CHAPS (Abbildung 12(f)), das zu der von den Gallensalzen abgeleiteten Detergenziengruppe gehört. Mit der Ausnahme des nichtionischen Detergenzes Tween 20 (Abbildung 12(c)) führten alle anderen Detergenzien zu einer Inaktivierung des Enzyms. Tween 20 führte zwar zu keiner Enzymaktivität im Solubilisat, unterschied sich jedoch dadurch von den anderen Detergenzien, daß eine Restaktivität in dem nach der Solubilisierung erhaltenen Pellet nachzuweisen war, also keine vollständige Solubilisierung stattgefunden hatte. Da jedoch keine Enzymaktivität im Solubilisat nachzuweisen war, wurde dieser Aspekt nicht weiter verfolgt.

Im Vergleich zur endogenen membrangebundenen Substratazetylierung wurde beim solubilierten System nur ein etwa 15-20 %iger Azetylierungsgrad erreicht.

3.2.2 Ermittlung der optimalen Detergenzkonzentration für die Solubilisierung der 4-OAT in Gegenwart endogenen Akzeptors

Um eine möglichst effektive Solubilisierung zu erzielen, wurde im Vorfeld weiterer Untersuchungen die für die Solubilisierung der 4-OAT optimale CHAPS-Konzentration bestimmt (↑ 2.2.5.3). Es stellte sich für dieses Testsystem heraus, daß eine optimale Solubilisierung durch eine 20 mM CHAPS-Konzentration erfolgte. Wurde die Konzentration des Detergenzes erhöht, nahm die meßbare Enzymaktivität wieder ab. Entsprechend der theoretischen CMC von etwa 6 mM (HJELMELAND *et al.*, 1983; BRITO und VAZ, 1986), die auch abhängig von der Salzkonzentration und damit der Ionenstärke der Lösung ist und ab der sich die CHAPS-Moleküle zu mizellaren Strukturen zusammenfügen, erhielt man bestätigend bei einer 6 mM CHAPS-Konzentration auch nur die Hälfte der maximal möglichen detektierbaren Enzymaktivität (vergleiche Abbildung 13).

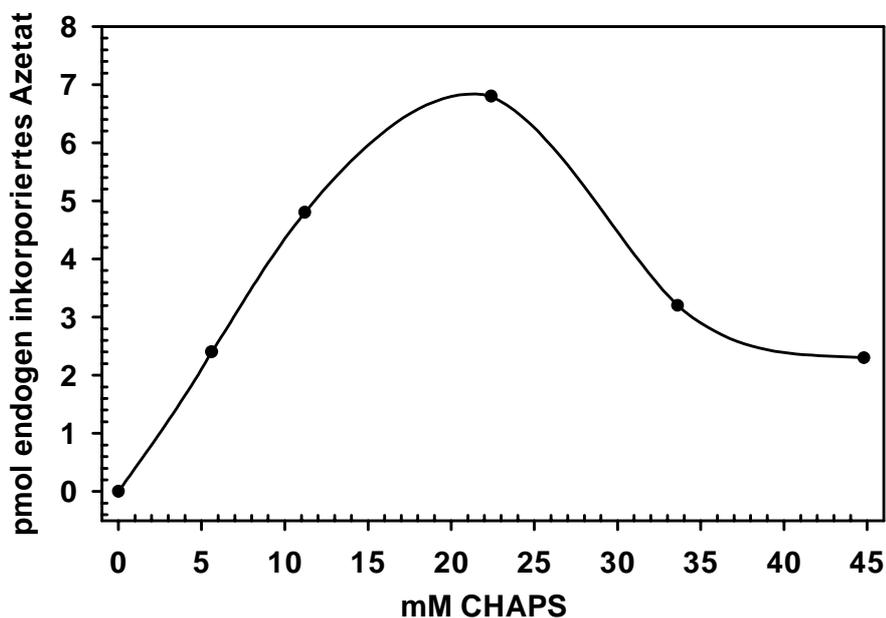


Abbildung 13: Ermittlung der optimalen CHAPS-Konzentration

Die optimale CHAPS-Konzentration, ermittelt in Enzymtest 1 mit endogenem Substrat, lag bei 20 mM CHAPS. Über das Optimum hinaus mußte mit erheblichen Einbußen der Enzymaktivität gerechnet werden.

3.2.3 Sialinsäureanalyse der im Enzymtest gefällten, radioaktiv markierten Proteine

Es war weiterhin notwendig, die Natur der enzymatischen Azetylierung zu erfassen. Eine Sialinsäureanalyse der durch PCA gefällten, radioaktiv markierten endogenen Proteine über milde Säurehydrolyse und Kationen- und Anionenaustausch führte wie im Falle des membrangebundenen Systems (IWERSEN *et al.*, 1998) zum Nachweis von nur einer azetylierten Sialinsäure, nämlich Neu4,5Ac₂ (Abbildung 14).

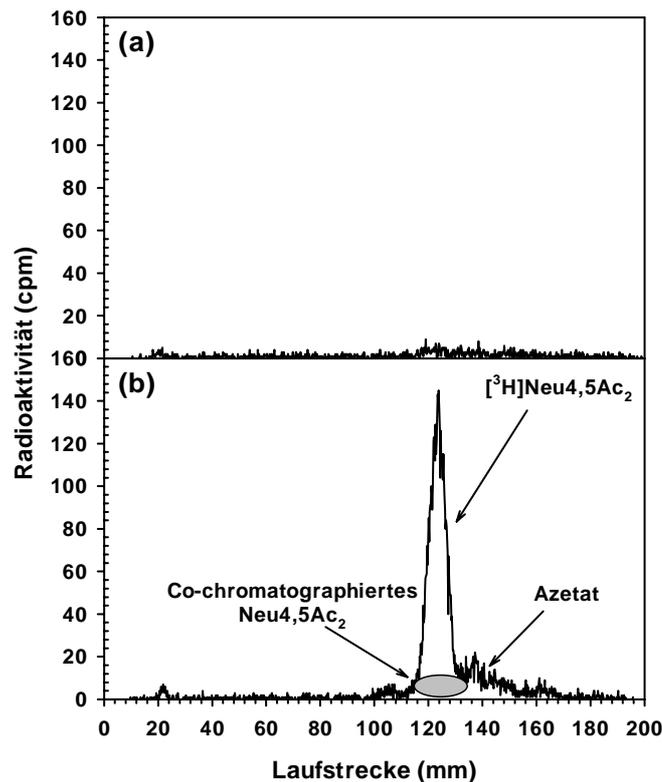


Abbildung 14: Sia-Radio-TLC-Analyse der endogenen Substrate aus dem CHAPS-Solubilisat nach Durchführung des Enzymtests 1.

Es wurde nur ein Produkt gebildet, das mit authentischem Neu4,5Ac₂ co-migrierte ((b), die Färbung des co-migrierten authentischen Neu4,5Ac₂ ist durch eine graue elliptische Markierung dargestellt.). Nach Verseifung in einer Ammoniakatmosphäre war das Produkt vollständig de-O-azetyliert (a).

3.3 Suche nach geeigneten exogenen Akzeptoren für die solubilisierete 4-OAT

Im Hinblick auf die Entwicklung eines sensitiven 4-OAT-Tests mußten andere, exogene Akzeptoren gesucht werden, da der Enzymtest mit endogenen Akzeptoren einerseits nicht empfind-

lich genug war, andererseits nicht genügend endogene Substrate zur Verfügung standen oder erst langwierig hätten charakterisiert und in großem Maßstab isoliert werden müssen.

3.3.1 Freie Sialinsäuren als exogene Akzeptoren

Die einfachste Möglichkeit des Einsatzes eines exogenen Substrats ist die Anwendung freier Sia. Da in der endogenen Sia-Analyse Neu4,5Ac₂ als einziges Produkt gefunden wurde, fiel die Wahl in erster Linie auf Neu5Ac als exogenes Substrat. Tatsächlich ließ sich das in großem Überschuß eingesetzte Neu5Ac durch die solubilisierte 4-OAT zu Neu4,5Ac₂ umsetzen (Abbildung 15).

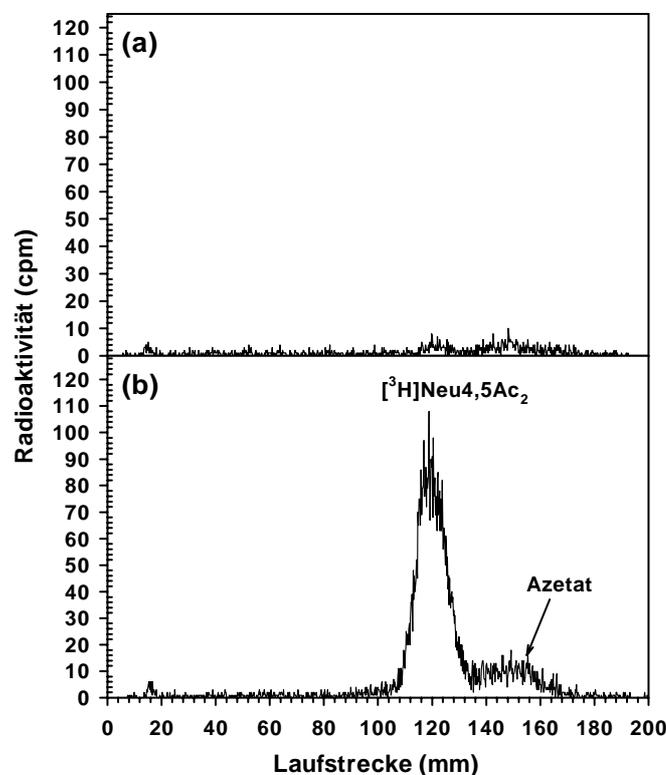


Abbildung 15: Neu5Ac als exogener Akzeptor ermittelt durch Enzymtest 3

Es wurde nur ein Produkt gebildet, das das gleiche Laufverhalten wie Neu4,5Ac₂ zeigte (b). Als Kontrolle diente die Inkubation ohne Neu5Ac (a).

Allerdings war die Empfindlichkeit nicht sehr groß und das Analyseergebnis lag erst nach jeweils drei Tagen vor. Unter den gleichen Bedingungen wurde auch Neu5Gc eingesetzt, jedoch mit geringerem Erfolg. Im Vergleich zu Neu5Ac betrug die 4-OAT Aktivität nur etwa 30 % (Abbildung 18), was sich später auch mit exogenem Neu5Ac/Neu5Gc-GM3 bewahrheitete (↑ 3.3.5).

Da Neu5Ac während der Untersuchungen lange Zeit als guter exogener Akzeptor galt, wurden noch einmal die optimale CHAPS-Konzentration und der zeitlicher Verlauf der Neu4,5Ac₂-Bildung untersucht. Dabei stellte sich erneut heraus, daß eine optimale Detergenzkonzentration existiert, über die hinaus eine Abnahme der meßbaren 4-OAT-Aktivität zu beobachten war (↑ 3.6.1). Allerdings lag das Optimum in diesem Fall bei etwa 14 mM CHAPS, also deutlich niedriger als bei Messungen mit endogenem Substrat (↑ 3.2.2). Betrachtete man den zeitlichen Verlauf der Azetylierung, so konnte eine schnelle Anfangsreaktion beobachtet werden, die aber schon nach 5 min sehr langsam in einen Sättigungsbereich einmündete (Abbildung 32). In dieser Hinsicht war dieser Enzymtest für kinetische Messungen kaum geeignet, da notwendigerweise im linearen, aber unempfindlichen Bereich des Enzymtests gearbeitet werden mußte. Die Auswertung wurde dadurch erheblich erschwert und konnte nur durch noch längere Detektionszeiten oder durch den Einsatz unvernünftig hoher Mengen Radioaktivität ausgeglichen werden.

3.3.2 Oligosaccharide als exogene Akzeptoren

Enzyme in diesem Bereich des Kohlenhydratmetabolismus erkennen oftmals nicht nur Monosaccharide, sondern vielmehr Oligosaccharide als Epitop, die auch deutlich besser umgesetzt werden als monomere Saccharide. Es war somit notwendig, bezüglich eines empfindlicheren Enzymtests nach anderen Substraten zu suchen. Sialosaccharide, die häufig als antigene Determinanten fungieren, sind die regioisomeren Sialyllaktosen (SL) und *N*-Azetylsialyllaktosamine (SLN) (MATROSOVICH *et al.*, 1993; HATTORI *et al.*, 1995; HANASAKI *et al.*, 1995; SIMON *et al.*, 1997; MAY *et al.*, 1997; HIRMO *et al.*, 1998). Die vier Trisaccharide (α 2,3-/ α 2,6-SL und -SLN) wurden auf ihre Akzeptorspezifität untersucht. Insgesamt wurde keine wesentliche Verbesserung des Testsystems festgestellt, obwohl die untersuchten Substrate zwei- bis vierfach besser umgesetzt wurden als Neu5Ac (Abbildung 18).

Dennoch konnte die Empfindlichkeit des Testsystems dadurch nicht entscheidend verbessert werden. Auch war anhand der getesteten Sialosaccharide keine eindeutige Bindungsspezifität nachzuweisen. Wohlwollend wäre eine Präferenz für die α 2,6-glykosidische Bindung zu beobachten. Nach wie vor muß an dieser Stelle betont werden, daß die Meßergebnisse mit den verwendeten Testsystemen recht ungenau sind und auch bei dreifachen Messungen diese Ungenauigkeit nicht zu vernachlässigen ist.

Ein anderes, beim Menschen sehr häufig anzutreffendes Sialosaccharid ist das Sialyl-Le^x-Tetrasaccharid (FUKUDA *et al.*, 1984; HOLMES *et al.*, 1986). Es kommt in diesem Tetrasaccharid sogar in *O*-azetylierter Form vor (JASS und ROBERTON, 1994; MANN *et al.*, 1997). Beim Vergleich mit den bisher getesteten Substanzen erzielte es eine fünffach höhere Aktivität als

Neu5Ac (Abbildung 18). Das durch Ozonolyse und β -Eliminierung aus GD3 gewonnene Tetrasaccharid (\uparrow 2.2.1.9) erwies sich ebenfalls nicht als Substrat der Wahl (Abbildung 18). Als ein anderer Ansatz wurden das Sialinsäuredimer und Tetramer ausgetestet, doch auch in diesem Fall war kein Erfolg zu verzeichnen. Zwar war das Tetramer ein besserer Akzeptor als das Dimer, doch eine wesentliche Verbesserung auch gegenüber dem Sialyl-Le^x-Tetrasaccharid zeichnete sich nicht ab.

3.3.3 CMP-Neu5Ac als exogener Akzeptor

Es wurde schon in Rind und Ratte beobachtet, daß OAT's vielleicht in der Lage sind, die β -glykosidisch gebundene Neu5Ac im Zuckernukleotid CMP-Neu5Ac zu *O*-azetylieren (CORFIELD *et al.*, 1976; SCHAUER und KAMERLING, 1997). Dieses Phänomen wäre eine metabolische Alternative zur abschließenden Modifikation von Sia im Golgi-Apparat nach der Sialylierung von Glykokonjugaten durch Sialyltransferasen und würde für das zusätzliche Vorkommen cytosolischer OAT sprechen. In Anbetracht der Effektivität einer solchen *O*-Azetylierung in den angegebenen Tieren ist aber eher von einem metabolischen Nebenweg auszugehen. Trotzdem wurde für die solubilisierete 4-OAT aus Meerschweinchenleber auch diese Alternative in Erwägung gezogen. Es stellte sich jedoch kein nennenswerter Effekt ein, der nicht auch schon mit anderen Komponenten erzielt worden wäre (Abbildung 18).

3.3.4 Glykoproteine als exogene Akzeptoren

Viele eukaryotische Proteine sind sialyliert und darüberhinaus in Organismen, die OAT exprimieren, auch *O*-azetyliert. So wurde z.B. auch im Meerschweinchen im Rahmen der Untersuchung der α_2 -Makroglobuline verschiedener Tierarten eine 4-*O*-Azetylierung dieses Serumproteins festgestellt, das verschiedene Saccharidepitope aufweist, an denen Sia immer $\alpha_{2,6}$ -glykosidisch verknüpft vorkommen (PRITCHETT und PAULSON, 1989; HANAOKA *et al.*, 1989). Das entsprechende humane Makroglobulin ist ähnlich dem des Meerschweinchens aufgebaut und fand deswegen auch als Testsubstanz Verwendung, wenn auch mit geringem Erfolg. Die Akzeptanz erwies sich als schlechter, verglichen mit der des bis zu diesem Zeitpunkt besten Substrats Sialyl-Le^x (Abbildung 18). Auch de-*O*-azetyliertes Meerschweinchenserum und solubilisierete oder fixierte Meerschweinchenerythrozytenmembranen eigneten sich erstaunlicherweise nicht als Akzeptoren.

Weiterhin wurden die Proteine Fetuin, Collocalia Muzin (CM), Pferdeunterkieferspeicheldrüsenmuzin (ESM) und Rinderunterkieferspeicheldrüsenmuzin (BSM) auf ihre Eignung als 4-OAT-Substrat untersucht. Die Muzine aus Pferd und Rind wurden vor der Nutzung de-*O*-azetyliert (\uparrow 2.2.1.13). Während ESM überhaupt nicht als Substrat zu verwenden war, zeigte sich

BSM immerhin um 60-70 % effektiver als Sialyl-Le^x, CM konnte dem Tetrasaccharid ebenbürtig eingesetzt werden. Die Akzeptanz von Fetuin war mit der des α_2 -Makroglobulins zu vergleichen (Abbildung 18).

3.3.5 Ganglioside als exogene Akzeptoren

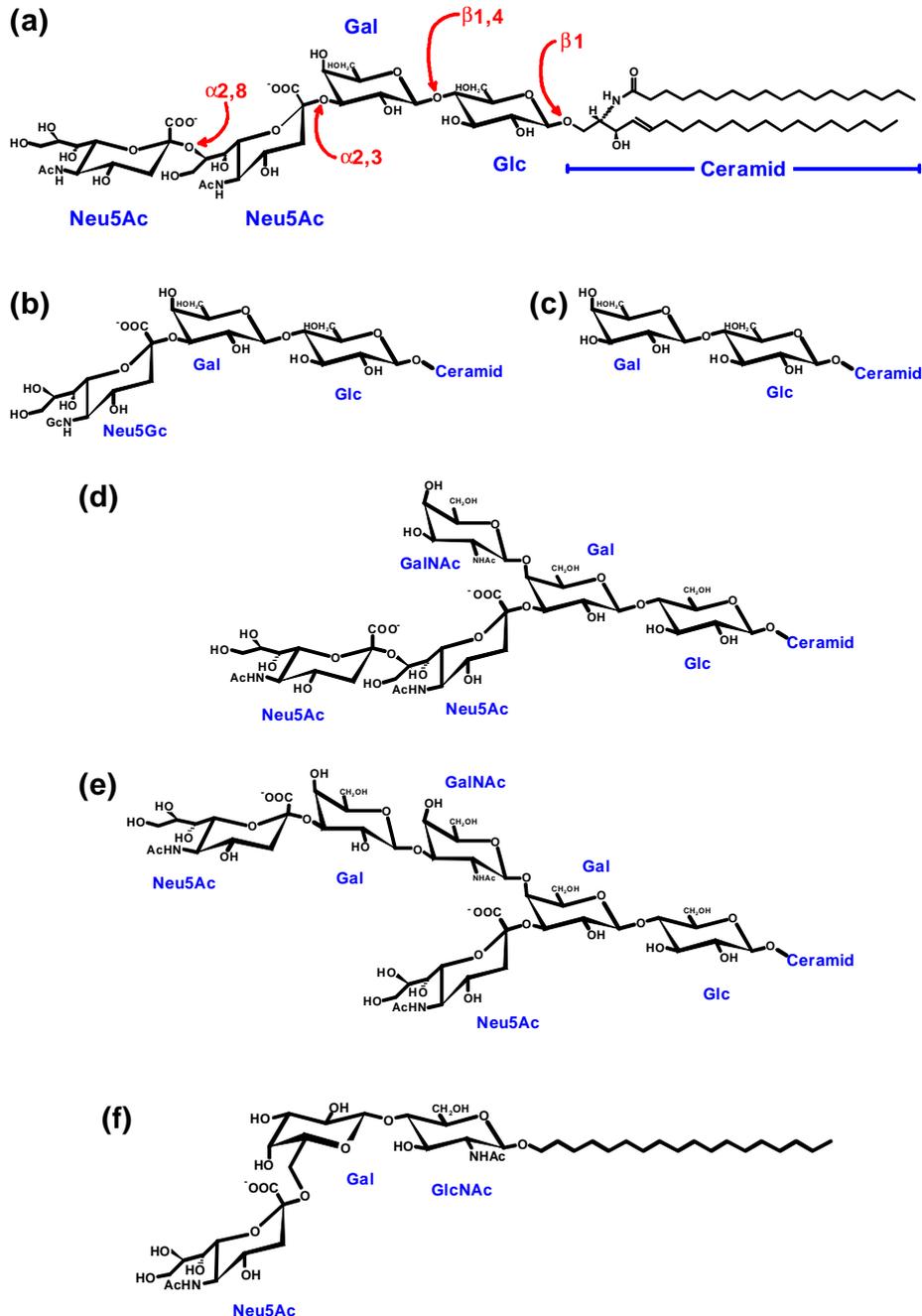


Abbildung 16: Strukturformeln von Gangliosiden und Glykolipiden, die als exogene Akzeptoren eingesetzt worden waren (Teil I)

Die Nomenklatur folgt der von Svennerholm (SVENNERHOLM, 1963).

- | | | | |
|-----|-----------------|-----|----------------|
| (a) | GD3 | (d) | GD2 |
| (b) | Neu5Gc-GM3 | (e) | GD1a |
| (c) | Laktosylceramid | (f) | neo-Glykolipid |

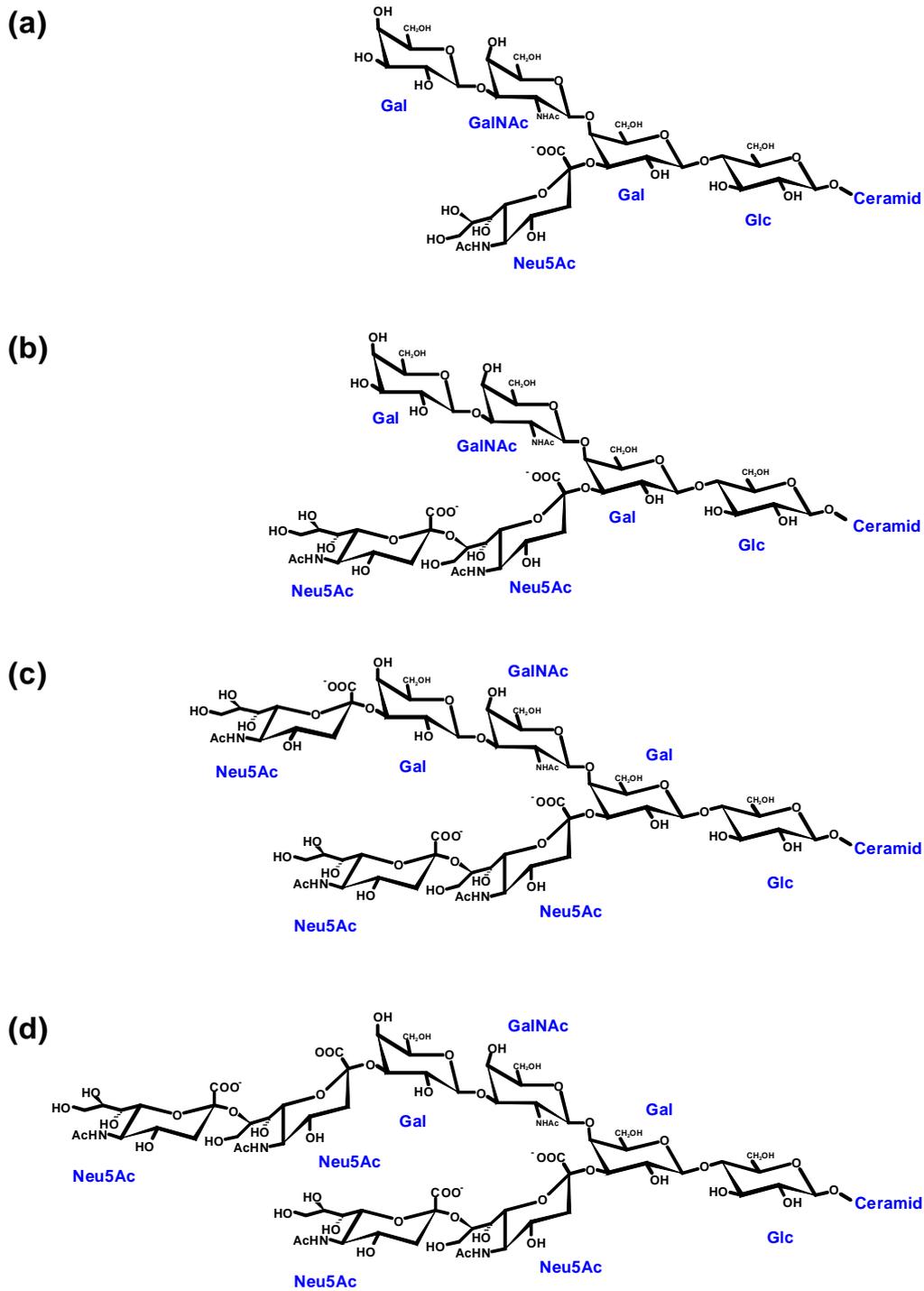


Abbildung 17: Strukturformeln von Gangliosiden und Glykolipiden, die als exogene Akzeptoren eingesetzt worden waren (Teil II)

Die Nomenklatur folgt der von Svennerholm (SVENNERHOLM, 1963).

(a) GM1b

(c) GT1b

(b) GD1b

(d) GQ1b

Der Durchbruch gelang erst, als Ganglioside als exogene Akzeptoren eingesetzt wurden. Obwohl zwischen den einzelnen getesteten Gangliosiden sehr starke Unterschiede in den Akzeptorspezifitäten festzustellen waren, boten sich Ganglioside in jedem Fall als die am besten geeigneten

ten Substrate an. Erst durch ihre Einführung konnte ein spezifisches, gut reproduzierbares, schnelles und sehr empfindliches Testsystem entwickelt werden (\uparrow 2.2.3.6). Die Aktivität bezüglich des am besten funktionierenden Tetrasialogangliosids GQ1b übertraf die des Neu5Ac um das 52-fache. Allein das Monosialogangliosid GM1b versagte als Akzeptor vollständig, gefolgt vom Monosialogangliosid Neu5Gc-GM3 und Neu5Ac-GM3, das in seiner Effektivität der des Disialogangliosids GD2 entsprach. Interessanterweise setzte sich die Beobachtung einer Präferenz der 4-OAT für Neu5Ac gegenüber Neu5Gc fort, wie am Monosialogangliosidpaar Neu5Ac-/Neu5Gc-GM3 festzustellen war. Eine allgemeingültige Voraussage, wann ein Gangliosid besser geeignet war als ein anderes, konnte indes nicht getroffen werden (Abbildung 18).

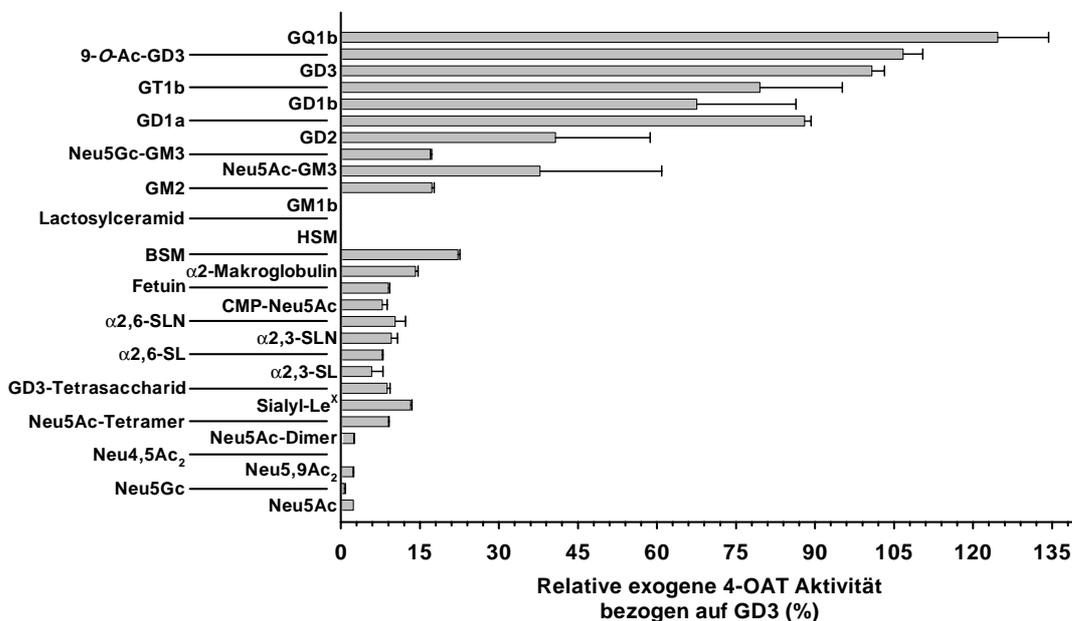


Abbildung 18: Exogene Akzeptoren der 4-OAT im Vergleich

Als Substrate für die 4-OAT wurden Monosaccharide, Oligosaccharide, Glykoproteine und Glykolipide ausgetestet. Deutliches Übergewicht in der Akzeptanz hatten die Ganglioside am oberen Abbildungsrand. Eine klare System innerhalb der Gangliosidfamilie war nicht zu erkennen. Neu5Ac wurde stets besser umgesetzt als Neu5Gc, 4-O-azetylierte Verbindungen waren keine Akzeptoren und 9-O-azetylierte Spezies zeigten gegenüber ihren underivatisierten Analoga keinen Unterschied in der Aktivität.

In Abbildung 19 ist ein vergleichendes Dünnschichtchromatogramm von acht Neu5Ac-Gangliosiden dargestellt. Da das Laufmittel stark unpolar, die stationäre Phase dagegen stark polar war, wurden diejenigen Ganglioside retardiert, die einerseits einen höheren Neutralzuckeranteil, andererseits bei gleichem Neutralzuckeranteil einen höheren Sialylierungsgrad aufwiesen. Es ist auch leicht einzusehen, daß die Ganglioside infolge der 4-O-Azetylierung unpolarer wurden und weiter migrierten als die nicht O-azetylierten Substanzen (Abbildung 19).

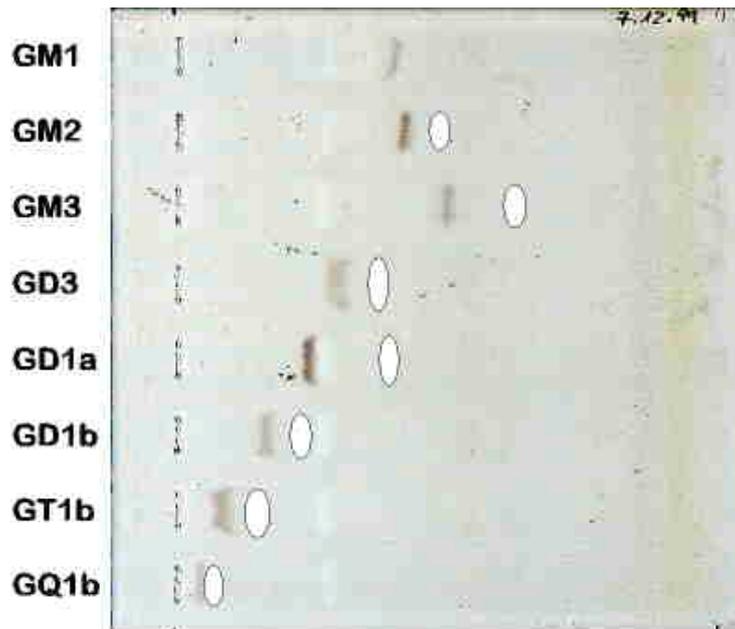


Abbildung 19: Vergleich des Laufverhaltens verschiedener Ganglioside

Ganglioside wurden auf Kieselgel 60-HPTLC-Platten analysiert. Bei dem Laufmittel handelte es sich um Chloroform/Methanol/20 mM wäbr. Kalziumchlorid (50:40:10; v/v/v). Die Platten wurden mit dem Bial-Sprühreagenz angefärbt. Radioaktive Banden (hier als grau umrandete weiße Ellipsen dargestellt) wurden mit einem TLC-Linear Analyzer bestimmt. Je höher der Neutralzuckeranteil im Gangliosid und je höher der Sialylierungsgrad bei gleichem Neutralzuckeranteil, desto stärker wurde es durch die stationäre Phase retardiert. Eine *O*-Azetylierung wirkte sich infolge des Verlusts an Polarität durch ein weiteres Laufverhalten aus.

Der Effekt überwog bei GD1a in solchem Maße, daß die Mobilität des 4-*O*-Ac-GD1a die des 4-*O*-Ac-GD3 übertraf, obwohl GD1a im nicht azetylierten Zustand langsamer als GD3 migriert. Eine 4-*O*-Azetylierung an jeder der beiden Sia in GD1a ist nicht auszuschließen. Auch die Michaelis-Menten-Kinetik zeigt just für dieses Gangliosid einen markanten Unterschied in V_{\max} und der katalytischen Aktivität (\uparrow 3.6.10.1).

3.4 4-*O*-Azetylierung exogener Substrate durch die membrangebundene 4-OAT

Durch Enzymtest 3 in der zweiten Variante (\uparrow 2.2.3.4) war es überraschenderweise möglich, die exogen zugesetzten Substrate Neu5Ac und α 2,3-Sialyllaktose zu 4-*O*-azetylieren. Konkret hieß dies, die 4-OAT muß den exogenen Substraten zugänglich geworden sein. Da die Membranen des Golgi-Apparates für solche Substrate nicht frei passierbar sind, mußte die Erklärung anderweitig gesucht werden. Es war anzunehmen, daß während der Aufarbeitung der Meerschweinchenleber zur Gewinnung der Golgi-Membranen ein Teil der Membranen zerrissen wurde, ihre Innenseite sich nach außen gekehrt hat oder die Membransäcke sich geöffnet hatten. Für diese Fälle sollte eine Sialyltransferaseaktivität in Abwesenheit von Detergens zu messen

sein, und tatsächlich fiel ein solcher Versuch positiv aus. Eine Graphik mit dem Vergleich der Aktivitäten ist in Abbildung 20 zu sehen.

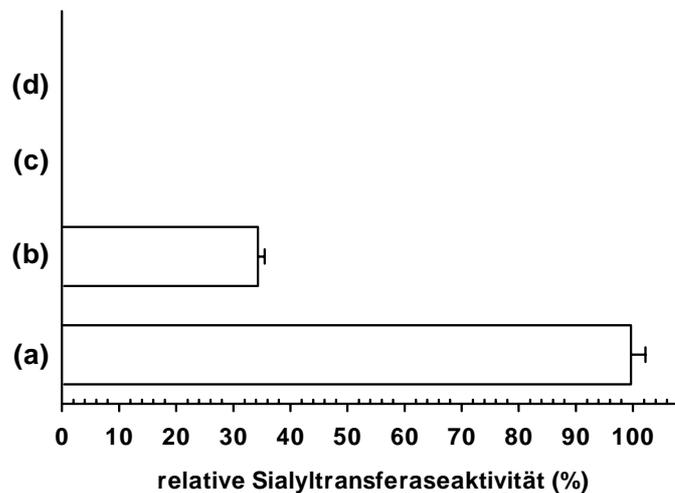


Abbildung 20: Die Sialyltransferaseaktivität in Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen bestimmt unter verschiedenen Parametern

Die membrangebundene 4-OAT war in der Lage, exogene Substrate umzusetzen. In Analogie dazu mußte auch eine membrangebundene Sialyltransferaseaktivität mit exogenen Substraten zu finden sein. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, wurde das exogene Substrat Asialofetuin im Vergleich zur in Detergenz bestimmten ST-Aktivität (a) zu immerhin mehr als 30 % umgesetzt (b). Eine ST-Aktivität mit endogenen Akzeptoren konnten in diesem Test weder in Gegenwart (c) noch in Abwesenheit von Detergenz (d) bestimmt werden.

3.5 Charakterisierung der Enzymprodukte

3.5.1 Alkalische De-*O*-azetylierungen

Ein erster Hinweis, ob es sich bei der von AcCoA auf Neu5Ac oder andere Sialoverbindungen übertragenen Azetylgruppe um eine *O*- bzw. *N*-Azetylierung handelt, läßt sich leicht durch alkalische De-*O*-azetylierung in Ammoniakatmosphäre oder mit 0.1 M Natronlauge bei RT oder 37 °C überprüfen (↑ 2.2.4.1). Während *O*-Azylester unter solchen Bedingungen gespalten werden, sind *N*-Azetylierungen stabil. Am Beispiel der Substrate Neu5Ac und GD3 ist in Abbildung 21 zu sehen, daß die enzymatisch durch die 4-OAT gebildeten azetylierten Produkte einer alkalischen Verseifung nicht standhielten und schon nach kurzer Zeit vollkommen de-*O*-azetyliert wurden. Auch die anderen untersuchten Azetylierungsprodukte konnten durch diese Methode erfolgreich de-*O*-azetyliert werden (Abbildung 21).

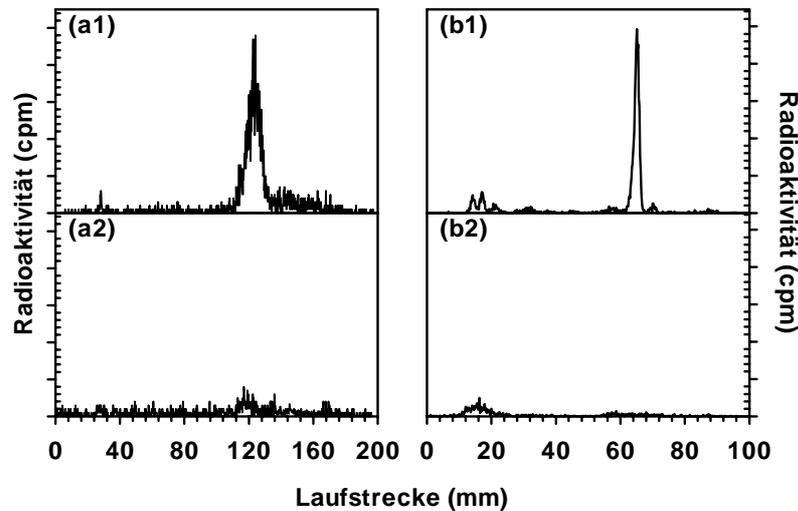


Abbildung 21: Alkalische Verseifung enzymatischer Azetylierungsprodukte

O-Azetylierte Sia wurden in Ammoniakatmosphäre schon nach wenigen Stunden vollständig de-*O*-azetyliert. Eine *N*-Azetylierung war unter solchen Bedingungen stabil. In den Graphen (a1) und (a2) ist das Radiodünnschichtchromatogramm enzymatisch *O*-azetylierter Neu5Ac vor und nach der Verseifung zu sehen. Die Graphen (b1) und (b2) zeigen das gleiche Verhalten für enzymatisch *O*-azetyliertes GD3.

3.5.2 Laktosylceramid als exogener Akzeptor

Laktosylceramid (Abbildung 16) kann als Asialo-GD3 aufgefaßt werden und wurde zur Bestätigung der Annahme, daß die Sia der Ganglioside als *O*-Azetylakzeptoren fungieren, als 4-OAT-Substrat ausgesetzt. Wie zu erwarten war und als weiterer Beweis unserer Annahme wurde Laktosylceramid nicht azetyliert (Abbildung 18).

3.5.3 Inaktivierung des Enzyms durch Hitze

Der Nachweis über eine enzymatische Reaktion wird untermauert, wenn die Reaktion durch Hitzedenaturierung unterbunden werden kann. So konnte auch im Fall der solubilisierten 4-OAT eine *O*-Azetylierung der Substrate Neu5Ac und GD3 vollständig verhindert werden (Abbildung 22).

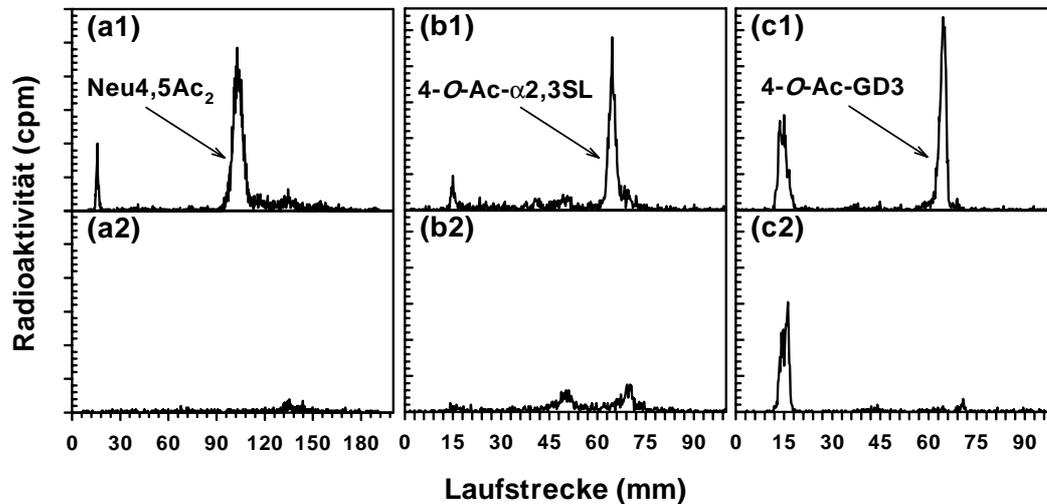


Abbildung 22: Inaktivierung der 4-OAT durch Hitzedenaturierung

Die meisten Enzyme lassen sich durch Hitze denaturieren. Somit konnte die Inaktivierung der 4-OAT durch Hitzedenaturierung (15 min bei 95 °C) als weiterer Beweis für eine enzymatische Reaktion gewertet werden. Die Denaturierung wurde mit den drei Substraten Neu5Ac (a), α 2,3SL (b) und GD3 (c) getestet. Die obere Reihe der Graphen (a1-c1) zeigt die Enzymaktivität vor der Hitzebehandlung, die untere Reihe (a2-c2) diejenige nach entsprechender Behandlung. Die 4-OAT-Aktivität wurde dadurch vollkommen zerstört.

3.5.4 Propionsäurehydrolyse des enzymatisch *O*-azetylierten GD3

Glykosidisch in GD3 gebundene Neu4,5Ac₂ sollte durch milde Säurehydrolyse abspaltbar und anschließend nachzuweisen sein. Es wurde deshalb das enzymatisch *O*-azetylierte GD3 in 2 M Propionsäure bei 80 °C hydrolysiert (\uparrow 3.7.1) und eine Sialinsäureanalyse durchgeführt. Das Ergebnis war enttäuschend. Zwar konnte Neu4,5Ac₂ nachgewiesen werden, allerdings erfüllte die Ausbeute keineswegs die Erwartung. Von der vorher analysierten Menge radioaktiven *O*-azetylierten GD3 hätte erwartungsgemäß höchstens 30-40 % durch die Säurehydrolyse de-*O*-azetyliert werden sollen (\uparrow 3.7.2). Das Ergebnis lag mit einer maximal 5 %igen Ausbeute aber weit unter diesem Wert. Es konnte jedoch durch das einfache Analysesystem aus Enzymtest 5 (\uparrow 2.2.3.6) und durch eine klassische Sialinsäureanalyse Neu4,5Ac₂ nachgewiesen werden (Abbildung 23).

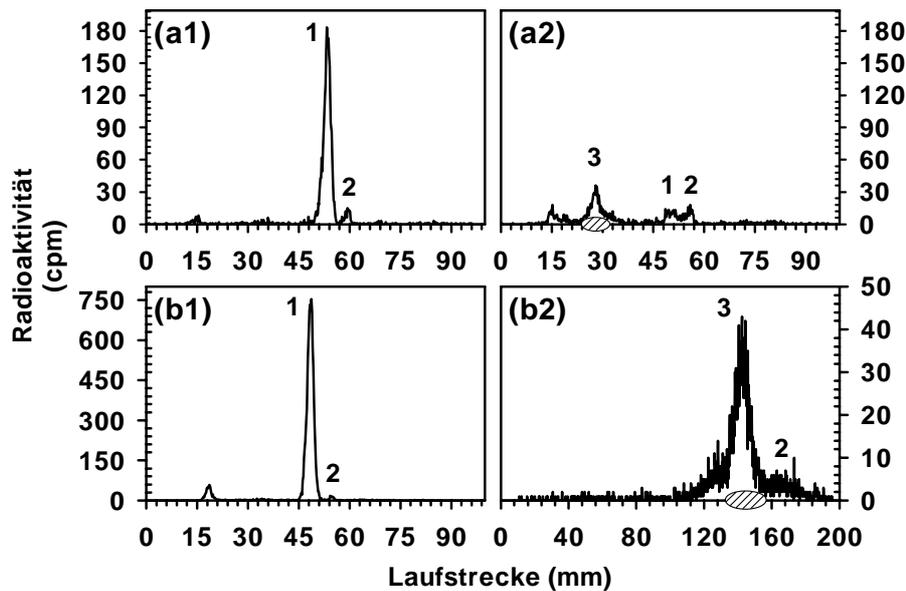


Abbildung 23: Propionsäurehydrolyse von 4-*O*-[³H]Ac-GD3

- (a) *O*-Ac-GD3 (a1) wurde mit Propionsäure hydrolysiert und auf Kieselgel 60 HPTLC-Platten analysiert. Ein Großteil der radioaktiven Markierung verschwand, und nur ein Bruchteil war in Neu4,5Ac₂ wiederzufinden (a2), das durch Co-Chromatographie mit einem authentischen Standard (schraffierte Markierung) identifiziert worden war.
- (b) Die gleiche Verfahrensweise wie unter (a) beschrieben wurde für eine Sia-Analyse auf Zellulosedünnschichtplatten verwandt. *O*-Ac-GD3 (b1) wurde nach Propionsäurehydrolyse zusätzlich durch Anionenaustausch gereinigt und auf Zellulose-DC analysiert. Die schraffierte Markierung weist auf die identischen Retentionsfaktoren für radioaktives Produkt und authentischen Standard hin. Zu beachten ist auch die veränderte Skalierung von (b2) gegenüber (b1).

1 = 4-*O*-Ac-GD3

2 = Azetat

3 = Neu4,5Ac₂

Wo die radioaktive Markierung, also das Azetat während der Säurehydrolyse verbleibt, konnte nicht nachgewiesen werden. Am desialylierten Gangliosid befand sich die Azetylgruppe nicht. Wahrscheinlich entstand während der Hydrolyse freies Azetat, welches im Lyophilisationsschritt der Analyseprozedur verdampft. Eine zweite theoretische Möglichkeit wäre der unter den Hydrolysebedingungen beschleunigte Isotopenaustausch der drei Tritiumatome der Azetylgruppe gegen Wasserstoffatome des Wassers oder Protonen der Säure, was allerdings eher unwahrscheinlich ist und in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

3.5.5 Sialidasebehandlung des enzymatisch *O*-azetylierten GD3

Während das Ergebnis der chemischen Hydrolyse der *O*-azetylierten Sia vom GD3 nur bedingt erfolgreich war, so konnte man von der schonenden enzymatischen Hydrolyse durch Sialidasen mehr Erfolg erwarten. Ein immer wiederkehrendes Problem der Analytik *O*-azetylierter

Sia ist die Tatsache, daß diese Sialinsäurespezies schlechte oder im Falle der 4-*O*-azetylierten Vertreter überhaupt keine Substrate für die meisten Sialidasen sind (CORFIELD *et al.*, 1986), was aber auf der anderen Seite auch für die Sia-Analytik ausgenutzt werden kann (IWERSEN *et al.*, 1998). Virale Sialidasen bilden oftmals Ausnahmen und sind in der Lage, die *O*-azetylierten Sia von Glykokonjugaten abzuspalten, wenn auch langsamer als nicht substituierte Spezies (CORFIELD *et al.*, 1986; KLEINEIDAM *et al.*, 1990). Dies machte man sich in zweierlei Hinsicht zunutze. Zum einen wurden Sialidasen aus *Vibrio cholerae* (VCS) und *Arthrobacter ureafaciens* (AUS) eingesetzt, die nicht in der Lage sind, 4-*O*-azetylierte Sia abzuspalten und bezüglich der Sia-Bindungen eine sehr breite Substratspezifität besitzen. Zum anderen wurde auch eine virale Sialidase aus dem Newcastle Disease Virus (NDVS) benutzt, die einerseits α 2,3-spezifisch ist, aber auch Neu4,5Ac₂ aus Gangliosiden abzuspalten vermag. Die eingesetzte Menge der Sialidasen war mit je 20 mU für AUS und VCS, bzw. 10 mU für NDVS in 100 μ l sehr hoch und die Inkubationszeit mit 1 h lang, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen (\uparrow 2.2.4.5). Das Ergebnis für die Behandlung des enzymatisch *O*-azetylierten GD3 mit AUS und VCS war eindeutig. Diese beiden Sialidasen waren nicht in der Lage, das eingesetzte Substrat zu spalten. Im Ansatz vorhandenes GD3 wurde in der gleichen Zeit vollständig umgesetzt. Dieses Ergebnis spricht eindeutig für ein 4-*O*-azetyliertes GD3 (Abbildung 24).

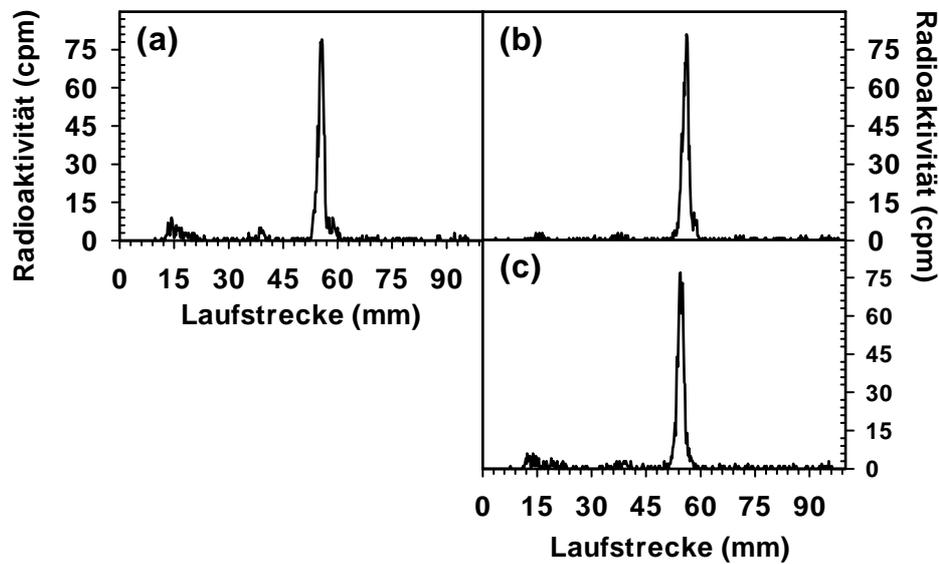


Abbildung 24: Sialidasebehandlung von 4-*O*-Ac-GD3 (Teil I)

4-*O*-Ac-GD3 wurde mit den Sialidasen AUS und VCS behandelt. Diese Enzyme sind nicht in der Lage, Neu4,5Ac₂ aus Sialosiden abzuspalten. Das Ergebnis fiel erwartungsgemäß aus. Die Radiodünnschichtchromatogramme nach der Inkubation mit AUS (b) und VCS (c) zeigten keinerlei Veränderung gegenüber der Kontrollinkubation (a).

Ganz anders sah das Ergebnis nach Inkubation mit NDVS aus. Das *O*-azetylierte GD3 war restlos umgesetzt worden. In eindeutiger Analogie zur chemischen Hydrolyse des Substrates stand die Tatsache, daß sich 90 % des aus der *O*-Azetylierung stammenden Azetats nicht mehr wiederfinden ließen (↑ 2.2.4.4). Nur 10 % des Azetats konnten in Neu4,5Ac₂ wiedergefunden werden (Abbildung 25). Eine Erklärung für den großen Verlust der radioaktiven Markierung steht noch aus.

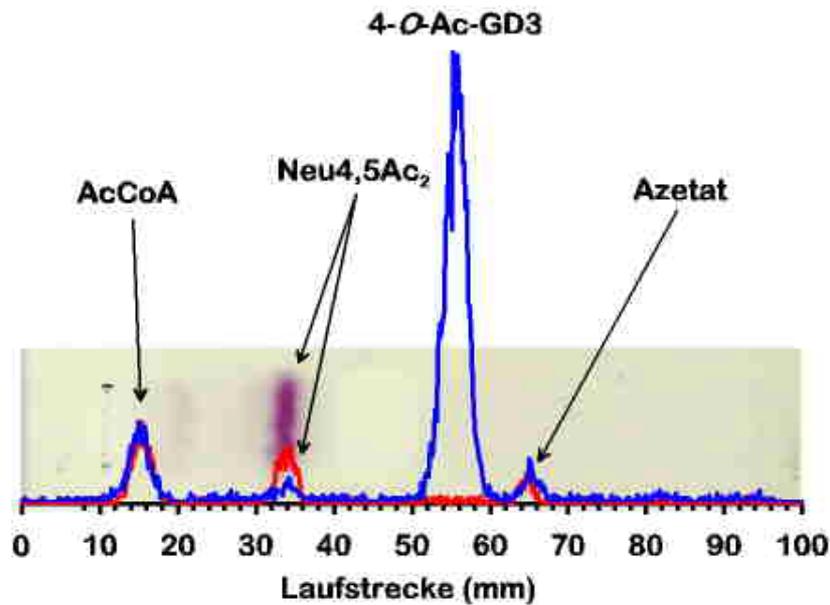


Abbildung 25: Sialidasebehandlung von 4-O-Ac-GD3 (Teil II)

4-O-Ac-GD3 wurde auch mit der Sialidase aus dem Newcastle Disease Virus behandelt, die einerseits spezifisch α 2,3-gebundene Sia, andererseits auch Neu4,5Ac₂ zu hydrolysieren vermag. Nach der Sialidasebehandlung wurde das radioaktive Produkt mit authentischer Neu4,5Ac₂ co-chromatographiert. Nach Färbung mit dem Bial-Sprühreagenz zeigte sich folgendes Bild: Im Vergleich zur Kontrollinkubation (blau dargestelltes Radiodünnschichtchromatogramm), wurde 4-O-Ac-GD3 vollständig abgebaut. Dagegen wurde aber ein sehr kleiner Teil als Neu4,5Ac₂ erhalten, das mit dem Standard identisch migrierte.

3.5.6 Neu4,5Ac₂, Neu5,9Ac₂ und Neu5,9Ac₂-GD3 als exogene Akzeptoren

Als Negativkontrolle diente die Inkubation der 4-OAT mit Neu4,5Ac₂ als Akzeptor (\uparrow 2.2.4.7). Würde das schon 4-O-azetylierte Substrat inkubiert werden, wäre eine radioaktive Markierung nicht mehr möglich. In diesem Sinne war das Experiment erfolgreich. Während Neu5Ac in einem Kontrollexperiment das gewünschte Produkt ergab, verlief die Inkubation von Neu4,5Ac₂ ohne jede Veränderung (Abbildung 18). Interessant war die Frage, ob eine O-Azetylierung der Neu5Ac an C-9 eine Änderung der Akzeptorspezifität bewirken würde. Als Resultat war kein Effekt festzustellen. Neu5,9Ac₂ wurde ebenso als Substrat erkannt, wie Neu5Ac selbst (Abbildung 18). Eine Bestätigung dieser Beobachtung ergab die enzymatische Umsetzung von dem Substrat Neu5,9Ac₂-GD3. Auch in diesem Fall verhielten sich 9-O-azetyliertes und nicht-O-azetyliertes GD3 gleich (Abbildung 18). Darüberhinaus zeigte eine Co-Chromatographie von durch die 4-OAT radioaktiv azetyliertem GD3 mit Neu5,9Ac₂-GD3 keine Identität der Retentionsfaktoren, was in Bezug auf die chromatographischen Unterschiede zwischen Neu4,5Ac₂ und Neu5,9Ac₂ bei schlechter auflösenden Chromatographiesystemen regelmäßig zu beobachten ist (IWERSEN *et al.*, 1998) (Abbildung 26).

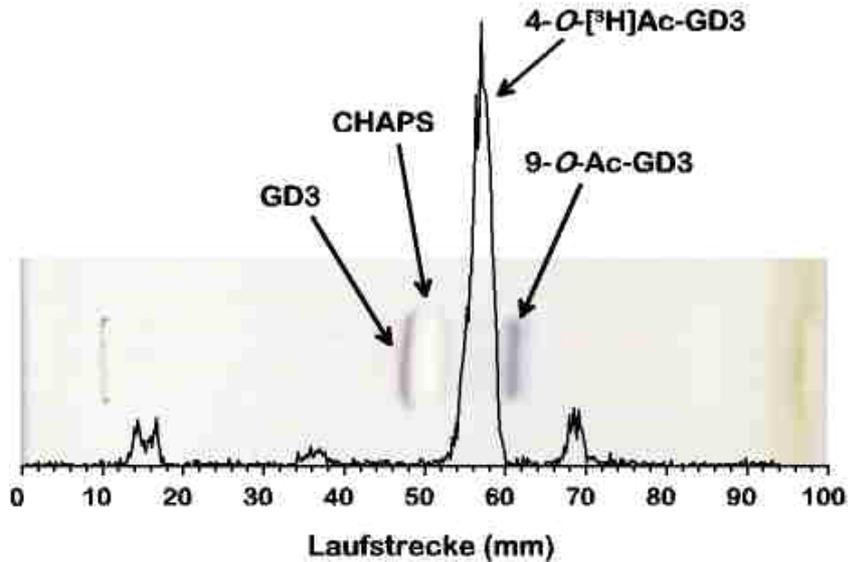


Abbildung 26: Co-Chromatographie von 4-O- $^{[3]H}$ Ac-GD3 mit 9-O-Ac-GD3

Aus der Abbildung ist klar ersichtlich, daß die beiden *O*-azetylierten GD3 kein identisches Laufverhalten zeigten. Dieses Chromatogramm bewies auch die sehr gute Trennungseigenschaft des benutzten DC-Systems (Chloroform/Methanol/20 mM wäßriges Kalziumchlorid (50:40:10; v:v:v)).

3.5.7 Neu5Ac-GM3 und Neu4Ac5Gc-/Neu5Gc-GM3 als exogene Akzeptoren

Durch die freundliche Unterstützung von Prof. Shinsei Gasa aus Sapporo in Japan, der aus Pferdeerythrozyten isoliertes Neu4Ac5Gc-GM3 zur Verfügung stellte, war es möglich, eines der entscheidenden Experimente zur Produktcharakterisierung durchzuführen. Zuerst mußte überprüft werden, ob Neu5Gc-GM3 selbst einen Akzeptor der 4-OAT darstellt. Dazu wurde ein Teil des Neu4Ac5Gc-GM3 de-*O*-azetyliert (\uparrow 2.2.1.13, Abbildung 27) und als Akzeptorsubstrat eingesetzt.

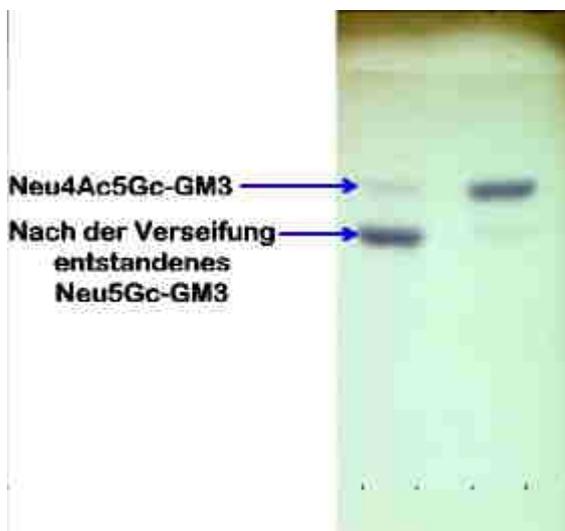


Abbildung 27:

Verseifungskontrolle für Neu4Ac5Gc-GM3

Die alkalische Verseifung des aus Pferdeerythrozyten gewonnenen Neu4Ac5Gc-GM3 verlief quasi quantitativ, was Grundvoraussetzung für den Einsatz als exogenes Substrat war.

Rechte Spur : Vor der Verseifung.
Linke Spur : Nach der Verseifung.

Wie aus Experimenten mit Neu5Ac-GM3 und durch Vergleichsstudien von Neu5Ac/Neu5Gc zu erwarten war, ließ sich Neu5Gc-GM3 *O*-azetylieren, allerdings im Vergleich zu Neu5Ac-GM3 zu lediglich 45 % (Abbildung 18). Durch Co-Chromatographie mit Neu4Ac5Gc-GM3 konnte ferner die Identität des neo-*O*-azetylierten Neu5Gc-GM3 als 4-*O*-Azetylderivat bewiesen werden (Abbildung 28). Neu4Ac5Gc-GM3 diente in Übereinstimmung mit allen vorher gemachten Beobachtungen selbst nicht als Akzeptor (Abbildung 18).

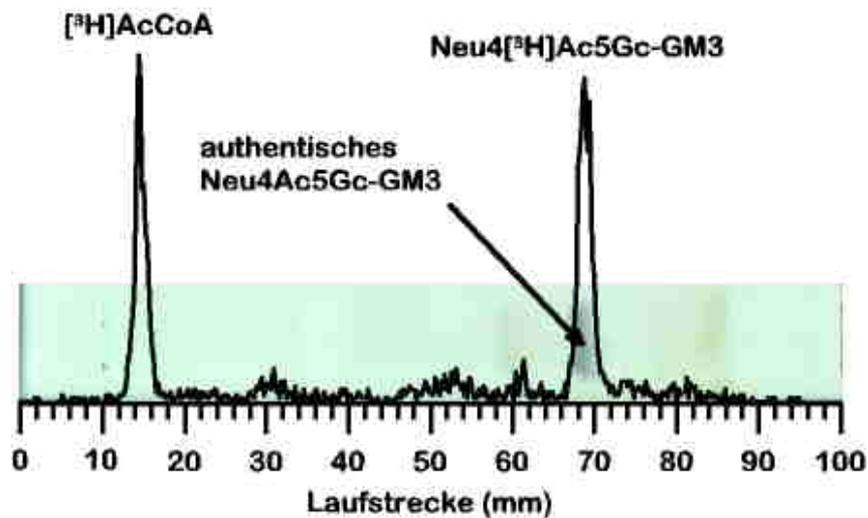


Abbildung 28: Co-Chromatographie von enzymatisch-*O*-azetyliertem Neu5Gc-GM3 mit authentischem Neu4Ac5Gc-GM3

Dieses Experiment bestätigte endgültig die in den anderen Experimenten zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte gesammelten Beweise für eine 4-OAT im Solubilisat aus Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen. Radioaktives Enzymprodukt und authentische Substanz zeigten das identische Laufverhalten. Erwartungsgemäß diente authentisches Neu4Ac5Gc-GM3 darüberhinaus nicht als Substrat.

3.5.8 Präparation von enzymatisch *O*-azetyliertem GD3

Um eine eindeutige Strukturklärung über das GD3-Azetylierungsprodukt zu erhalten, war eine größere nichtradioaktive Präparation mit anschließender massenspektrometrischer Klärung sehr geeignet. Vor diesem Hintergrund wurde versucht, genug Material für eine solche Untersuchung zu erhalten (↑ 2.2.4.12). Insgesamt war das Ergebnis aus mehreren, nicht genau bestimm- baren Gründen unbefriedigend. Einerseits war die angestrebte Menge von 1 µg Reinsubstanz ein Problem, da nur in begrenztem Umfang genügend Enzymquelle zur Verfügung stand und weiterhin eine ganze Reihe von Reinigungsschritten notwendig waren, um ein sauberes Endprodukt zu erhalten. Auf diesem Weg sind bei der Präparation von Mikromengen Verluste und auch Abbau des Produkts möglich. Trotzdem war nach Hydrolyse der isolierten Substanz durch die fluorimetrische HPLC nach Hara *et al.* zumindestens festzustellen, daß das enzymatisch präparierte Produkt Neu5Ac-haltig war (Abbildung 29). Immerhin widerlegte das Hydrolyseexperiment

nicht die zuvor erhaltenen Ergebnisse und läßt sich durch die zuvor beobachteten Probleme bei der Säurehydrolyse gut erklären (\uparrow 3.5.4).

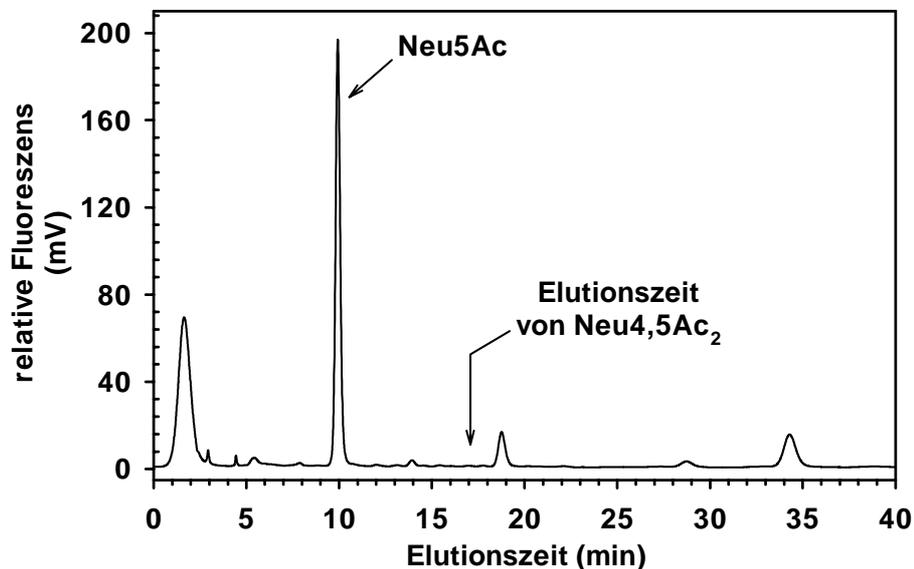


Abbildung 29: HPLC-Analyse von durch Säurehydrolyse abgespaltener Sia aus enzymatisch präparierten 4-*O*-Ac-GD3

Nur Neu5Ac war als Sia-Peak zu identifizieren. Zu der Zeit, zu der Neu4,5Ac₂ eluiert, wurde keine Substanz detektiert.

3.5.9 Inkubation von GD3 mit der solubilisierten 4-OAT und nicht radioaktivem AcCoA mit anschließender Analyse

Ein anderer Ansatz, um das Reaktionsprodukt zu charakterisieren, war die enzymatische *O*-Azetylierung von GD3 unter nichtradioaktiven Bedingungen mit anschließendem Ausdialysieren der Salze, Lyophilisation und Säurehydrolyse des Rückstandes. Im letzten Schritt wurden die abgespaltenen Sia ausdialysiert, wobei das Detergenz und die desialylierten Glykolipide als Mizellen zurückblieben. Die ausdialysierten Sia wurden anschließend über HPLC analysiert (\uparrow 2.2.2.3.1). Dieses Verfahren wurde als Kontrolle auch in Abwesenheit von GD3 durchgeführt, damit deutlich wurde, welcher durch endogene 4-*O*-Azetylierung erzeugte "Hintergrund" erwartet werden mußte.

Das Ergebnis war in Bezug auf die Quantität der gesuchten Neu4,5Ac₂ zwar schwach ausgeprägt, fiel jedoch qualitativ eindeutig aus (Abbildung 30). Es war bei Inkubation mit GD3 eine Zunahme von Neu4,5Ac₂ zu verzeichnen, die zusätzlich durch eine Mischanalyse mit authentischem Neu4,5Ac₂ bestätigt wurde.

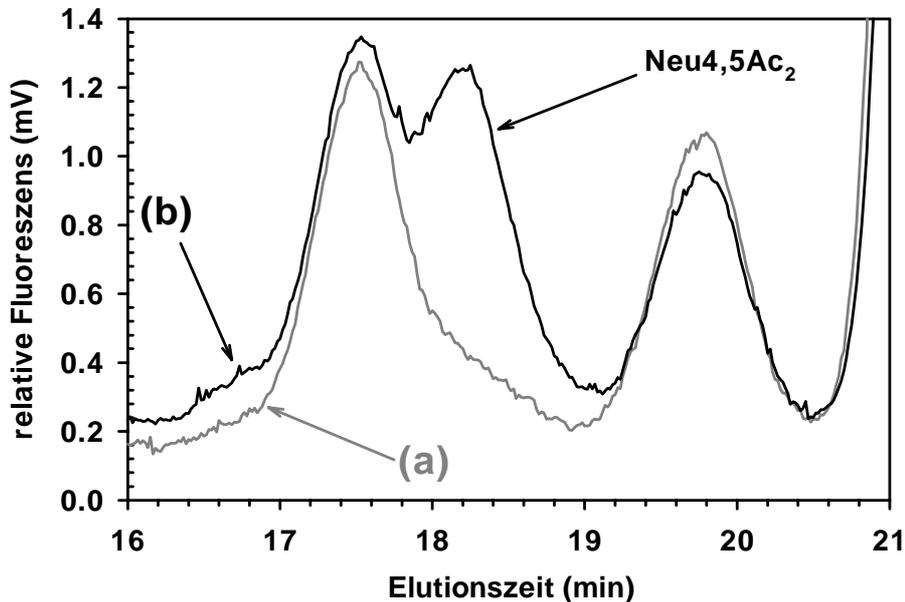


Abbildung 30: HPLC-Analyse von durch Säurehydrolyse abgespaltenen Sia aus nicht radioaktivem mit GD3 und AcCoA inkubiertem Solubilisat

Im Vergleich zur Kontrollinkubation ohne GD3 (grauer Graph (a)) entsteht bei Inkubation mit GD3 nach Säurehydrolyse Neu4,5Ac₂ (schwarzer Graph (b)). Zum wiederholten Male wurde beobachtet, daß Neu4,5Ac₂ nach Säurehydrolyse nicht in der erwarteten Konzentration gebildet wurde.

3.6 Charakterisierung der 4-OAT-Reaktion

Nachdem durch die Produktanalyse im vorhergehenden Abschnitt geklärt worden war, daß es sich bei dem aus Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen solubilisierten Enzym in der Tat um die gesuchte 4-OAT handelte, wurde begonnen, die Enzymreaktion im Hinblick auf die anvisierte Reinigung näher zu charakterisieren.

3.6.1 Bestimmung der optimalen Detergenzkonzentration mit exogenen Akzeptoren

Wie bereits beschrieben, stellte sich bei der Bestimmung der optimalen CHAPS-Konzentration für Neu5Ac ein ähnlicher, wie schon bei endogenem Substrat beobachteter Sachverhalt ein, mit dem Unterschied, daß sich das Optimum im Falle des exogen eingesetzten Neu5Ac zu einem niedrigeren Wert verschoben hatte (↑ 3.2.2).

Für das exogene Substrat GD3 ergab sich ein ganz anderes Resultat. Zwar wurde bei einer 14 mM CHAPS-Konzentration das Optimum ermittelt, doch nahm die Enzymaktivität bei höhe-

ren CHAPS-Konzentrationen nicht ab, sondern bildete ab dem Optimum ein Plateau (Abbildung 31).

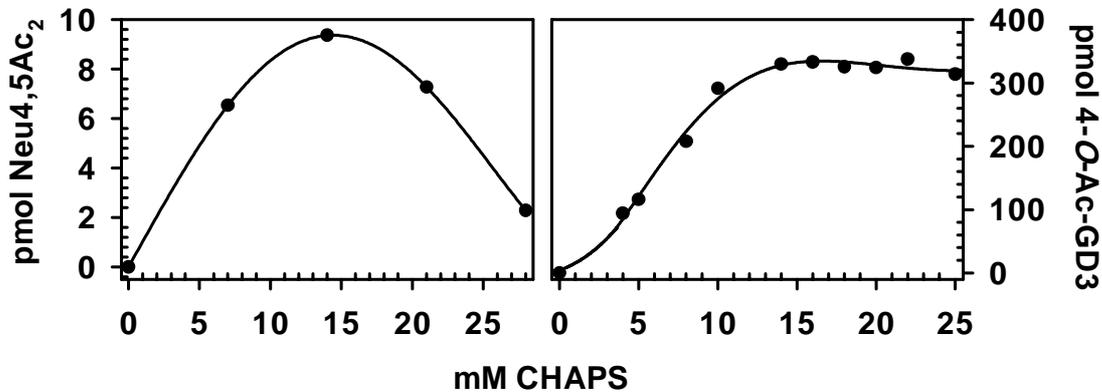


Abbildung 31: Bestimmung der optimalen CHAPS-Konzentration zur Solubilisierung der 4-OAT in Gegenwart exogener Akzeptoren

Im Gegensatz zu Neu5Ac als exogenem Akzeptor (a), das wie im Falle des endogenen Substrats ein scharfes Maximum der Detergenzkonzentration bildete, wurde bei exogenem GD3 (b) ab der optimalen CHAPS-Konzentration ein Plateau ausgebildet. Das Optimum lag in beiden Fällen bei 14 mM CHAPS und damit niedriger als bei endogenem getestetem Substrat.

3.6.2 Zeitabhängigkeit der 4-OAT-Reaktion für Neu5Ac und GD3

Für die korrekte Auswertung der Enzymtests und gerade in Hinblick auf kinetische Messungen war es notwendig, die Charakteristik des Azetateinbaus in die Substrate zu kennen (\uparrow 2.2.5.4). Der zeitliche Verlauf des Azetateinbaus unterschied sich bei den beiden Substraten Neu5Ac und GD3. Für Neu5Ac erstreckte sich der lineare Bereich der Reaktion auf die ersten 5 bis maximal 10 min. Nach dieser Zeit mündete die Kurve sehr langsam in den Sättigungsbereich ein, der nach 60 min noch immer nicht ganz erreicht war. Im Gegensatz hierzu verlief die GD3-4-O-Azetylierung viel eindeutiger. Der lineare Bereich der Azetataufnahme war nach 20 min beendet und erreichte nach 40 min das Sättigungsplateau (Abbildung 32).

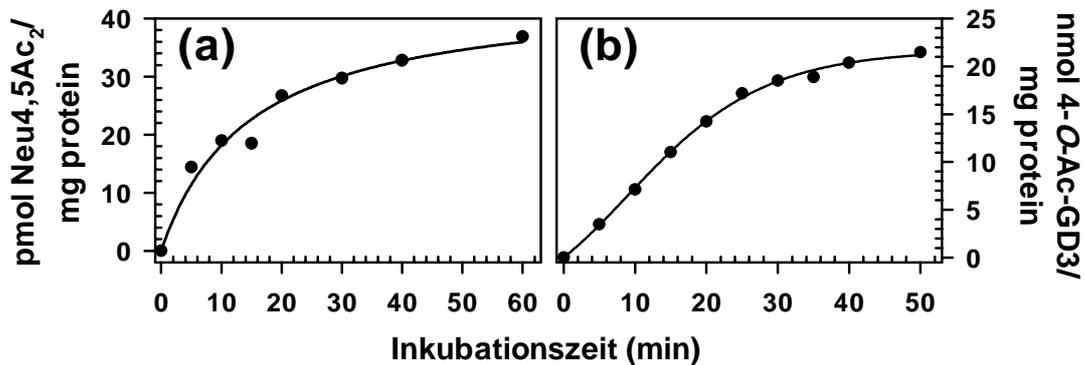


Abbildung 32: Bestimmung des Zeitverlaufs der 4-O-Azetylierung von Neu5Ac und GD3

Beide Substrate zeigten eine typische Sättigungscharakteristik. Der lineare Teil der Graphen beschränkte sich im Falle von Neu5Ac auf die ersten 5 min (a), was in etwa dem membranengebundenen System entsprach, allerdings wurde im Unterschied hierzu der Sättigungswert danach erst sehr langsam erreicht. Für exogenes GD3 erstreckte sich der lineare Bereich auf 15 bis 20 min und mündete alsbald in ein Plateau (b).

3.6.3 Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Temperatur

Das Temperaturoptimum lag für das solubilisierte Enzym, wie auch für das membranengebundene System bei 30 °C. Das Optimum war allerdings schärfer umrissen und schloß nur einen relativ engen Bereich zwischen 25 und 33 °C ein (Abbildung 33).

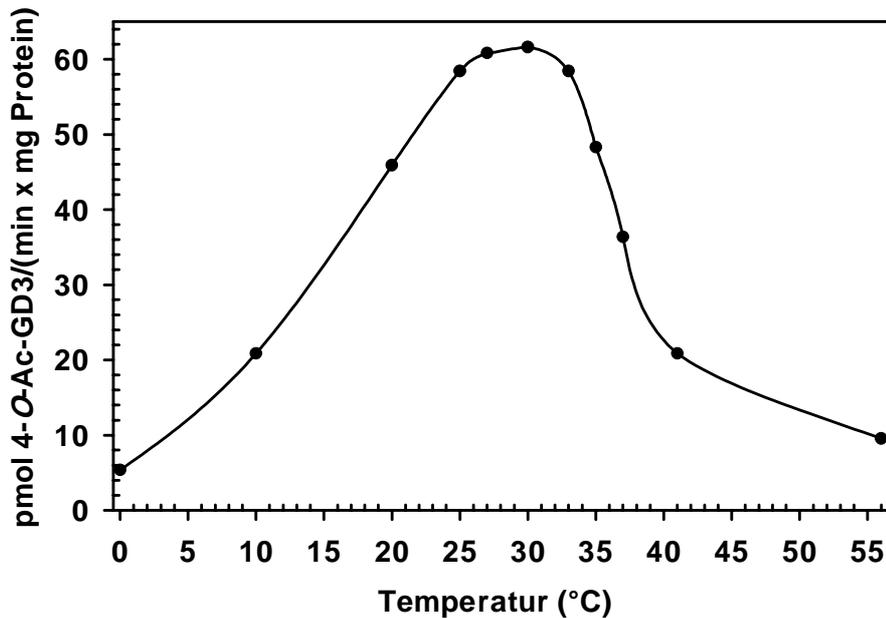


Abbildung 33: Bestimmung des Temperaturoptimums der 4-O-Azetylierung von GD3

GD3 wurde bei 30 °C optimal umgesetzt. Darüberhinaus kam es zu einer raschen Aktivitätsabnahme. Dieser Wert entspricht genau dem im membrangebundenen System.

3.6.4 Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion vom pH-Wert

Vom membrangebundenen System ausgehend war ein optimaler pH im nahezu neutralen Bereich erwartet worden (IWERSEN *et al.*, 1998). Die Ermittlung des optimalen pH-Werts (↑ 2.2.5.6) ergab allerdings, daß der Wert um etwa eine Größeneinheit in den sauren Bereich verschoben war. Für das solubilisierte Enzym wurde ein zwischen pH 5.4 und pH 5.8 liegender optimaler Bereich ermittelt (Abbildung 34).

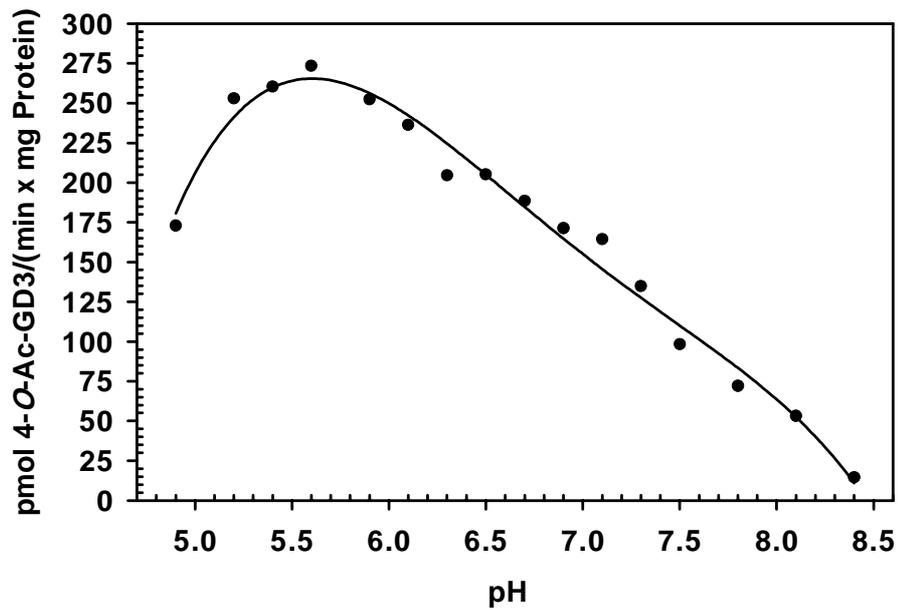


Abbildung 34: Bestimmung des pH-Optimums der 4-O-Azetylierung von GD3

Das pH-Optimum wurde zwischen pH 5.4 und 5.8 ermittelt, ein Wert, der im Vergleich zur membrangebundenen 4-OAT um eine Größeneinheit in den sauren Bereich verschoben war.

3.6.5 Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Pufferkonzentration

Die optimale Phosphatpufferkonzentration reichte von etwa 50 bis 65 mM Kaliumphosphat, was ungefähr dem optimalen Wert des membrangebundenen Systems (70 mM) (IWERSEN *et al.*, 1998) entsprach (Abbildung 35).

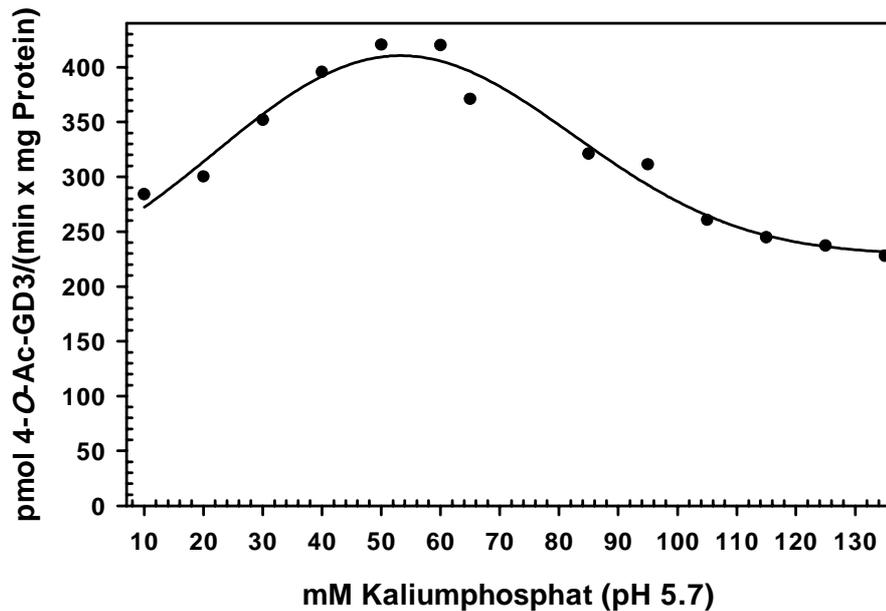


Abbildung 35: Bestimmung des Kaliumphosphatoptimums der 4-O-Azetylierung von GD3

Das relativ breite Optimum bezüglich der Pufferkonzentration erstreckte sich auf einen Bereich zwischen 50 bis 65 mM Kaliumphosphat und kam damit dem Optimum der membrangebundenen 4-OAT mit 70 mM nahe.

3.6.6 Abhängigkeit der 4-OAT-Reaktion von der Kaliumchloridkonzentration

Das Optimum bezüglich der Kaliumchloridkonzentration stellte sich als sehr breit heraus. Zwischen 45 mM und 65 mM Kaliumchlorid war die Ausbeute an *O*-azetyliertem GD3 annähernd gleich (Abbildung 36).

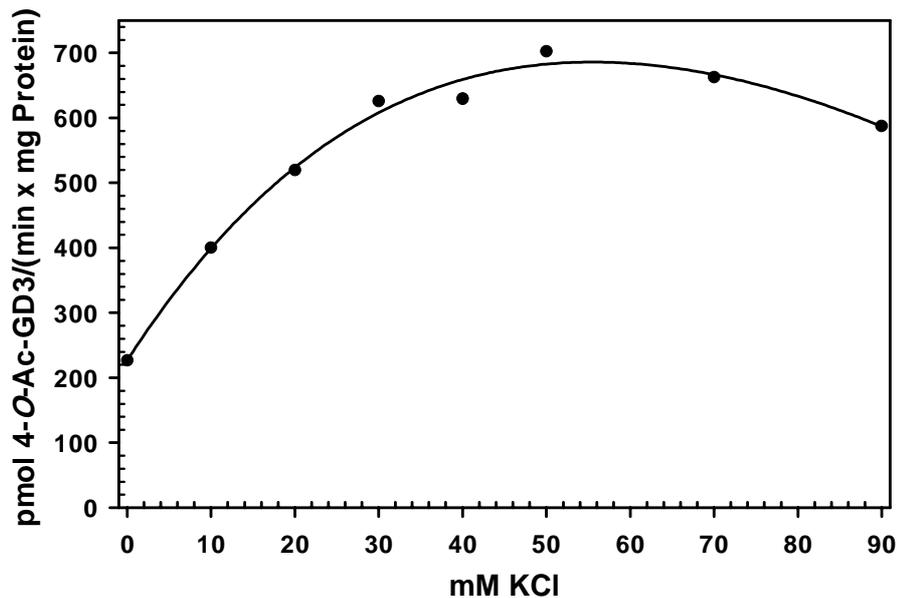


Abbildung 36: Bestimmung des Kaliumchloridoptimums der 4-O-Azetylierung von GD3

Zwischen 45 und 65 mM lag das Kaliumchloridoptimum der solubilisierten 4-OAT und damit etwas niedriger als das entsprechende Optimum des membrangebundenen Enzyms mit 90 mM.

Im Vergleich zum nicht solubilisierten Enzym (90 mM; (IWERSEN *et al.*, 1998)) war die optimale Kaliumchloridkonzentration der solubilisierten 4-OAT mit etwa 55 mM leicht zu kleineren Werten verschoben (Abbildung 36).

3.6.7 Reversible Inhibition der 4-OAT-Reaktion durch hohe Kaliumchloridkonzentrationen

Für spätere Enzymreinigungsschritte war es wichtig festzustellen, ob die Hemmung des Enzyms durch hohe Salzkonzentrationen reversibel ist. Zumal viele Reinigungsprotokolle mit Ionenaustauschern, aber auch Affinitätsmatrizes, die Elution mit hohen Salzkonzentrationen ausnutzen. Ausgehend von einem 200 mM Kaliumchlorid enthaltenden Inkubationspuffer wurde die Salzkonzentration in mehreren Ansätzen auf den Optimalwert von 50 mM Kaliumchlorid verdünnt und die Enzymaktivität bestimmt (\uparrow 2.2.5.9). Als Ergebnis konnte festgehalten werden, daß die Inhibition der solubilisierten 4-OAT vollständig reversibel war (Abbildung 37).

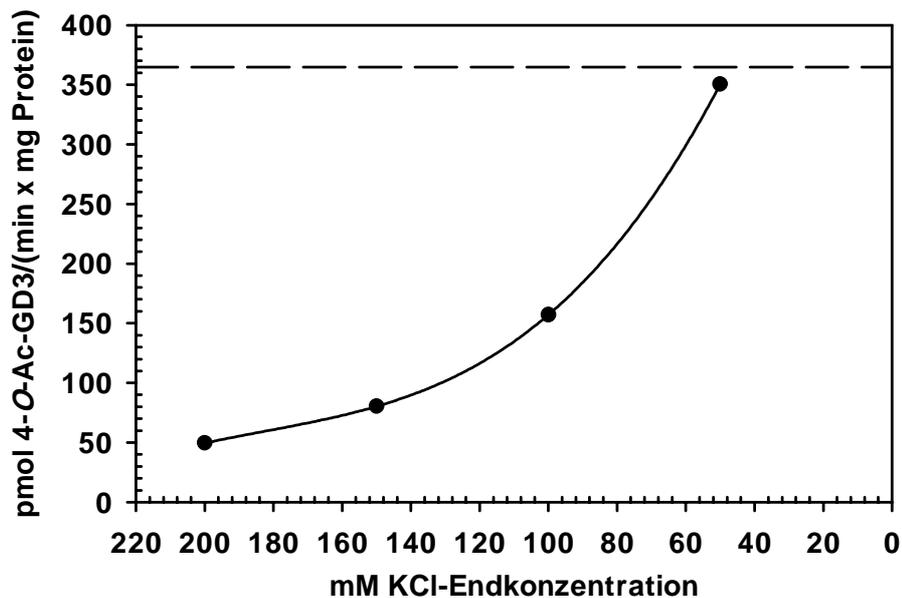


Abbildung 37: Reversible Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch Kaliumchlorid

Ausgehend von einer 200 mM Kaliumchloridkonzentration konnte die ursprüngliche 4-OAT-Aktivität in Verdünnungsexperimenten wieder regeneriert werden. Die gestrichelte Linie spiegelt die in einem Kontrollexperiment unter optimalen Bedingungen ermittelte 4-OAT-Aktivität wieder.

3.6.8 Abhängigkeit der solubilisierten und membrangebundenen 4-OAT-Reaktion vom Proteingehalt

Die Proteinabhängigkeit des membrangebundenen Systems wurde mit dem des solubilisierten Systems verglichen. In ersterem Fall waren die Akzeptoren endogener Natur und ihre Konzentration wurde mit steigender Proteinkonzentration entsprechend erhöht. Für das solubilierte System war die Konzentration des exogenen Akzeptors Neu5Ac konstant. Es konnte für die solubilierte 4-OAT ein linearer Anstieg der Neu4,5Ac₂-Synthese bis zu der experimentell bestimmten Konzentration von 375 µg Protein beobachtet werden. In diesem Bereich blieb die spezifische Aktivität konstant, waren Substrate also immer im Überschuss vorhanden (Abbildung 38(a)). Ganz anders sah das Bild für die membrangebundene, mit endogenem Substrat getestete 4-OAT aus. Während die *O*-Azetylierung mit steigender Proteinkonzentration linear anstieg, nahm die spezifische Aktivität ab, ein Zeichen dafür, daß bei erhöhtem Proteingehalt eines der oder beide Substrate die Syntheseleistung begrenzten (Abbildung 38(b)).

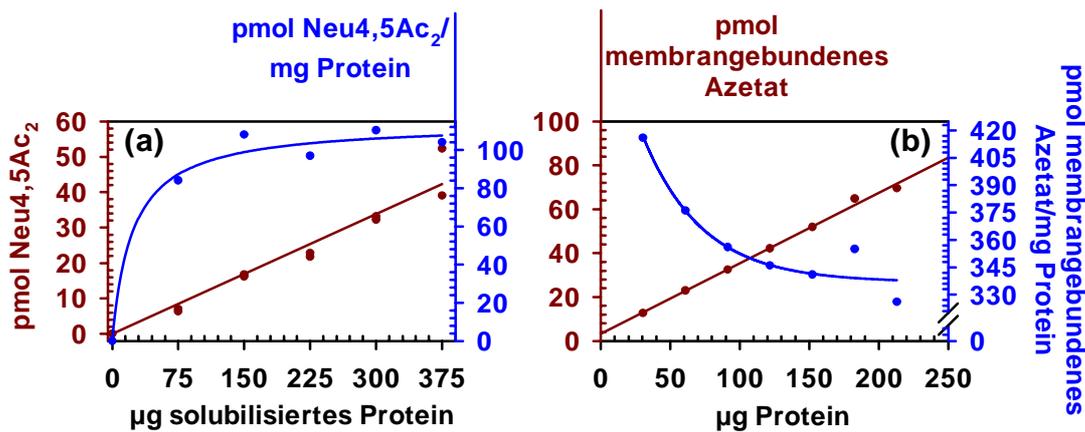


Abbildung 38: Proteinabhängigkeit der solubilisierten und membrangebundenen 4-OAT-Aktivität

Im Bereich des bis 370 µg inkubierten Proteins verhielt sich die 4-*O*-Ac-GD3-Synthese für das solubilierte Enzym linear (a). Bezogen auf den Proteinanteil ergab sich kein Sättigungswert wie im Falle des membrangebundenen Systems (b).

3.6.9 Experiment zur Nachinkubation mit AcCoA

Da während der Inkubation AcCoA als Substrat verbraucht wird und gleichzeitig der kompetitive Inhibitor CoA entsteht (\uparrow 2.2.5.11), ist es möglich, daß die Enzymreaktion nach einiger Zeit nicht mehr unter den optimalen Bedingungen abläuft. Eine nachträgliche Zugabe des Substrats würde in diesem Fall helfen, die 4-OAT optimal arbeiten zu lassen.

Für die 4-OAT konnte kein solcher Effekt nachgewiesen werden. Auch nach Zugabe von AcCoA erhöhte sich die Neu4,5Ac₂- und 4-*O*-Ac-GD3 Syntheseleistung nicht.

3.6.10 Kinetische Aspekte

3.6.10.1 Michaelis-Menten-Kinetik für die Substrate AcCoA, GM3, GD3, GD1a und GD1b

Es war möglich, für alle betrachteten Substrate eine Michaelis-Menten-Kinetik durchzuführen (\uparrow 2.2.5.12.1). Folgende Werte wurden dabei ermittelt:

Tabelle 3: Daten der Kinetischen Messungen der solubilisierten 4-OAT

Substrat	Michaelis-Menten-Konstante K_M [μM]	Maximale Geschwindigkeit v_{max} [$\text{pmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$]	katalytische Effizienz [$1/\text{mol} \cdot \text{s} \cdot \text{mg Protein}$]
AcCoA	3.6 (mit GD3 als Akzeptor)	215 (mit GD3 als Akzeptor)	9.95×10^{-7}
GM3	8.4	235	4.66×10^{-7}
GD3	1.2	1310	1.82×10^{-5}
GD1a	2.2	2136	1.62×10^{-5}
GD1b	2.5	1385	9.23×10^{-6}

Die dazugehörigen Graphen sind in Abbildung 39 dargestellt.

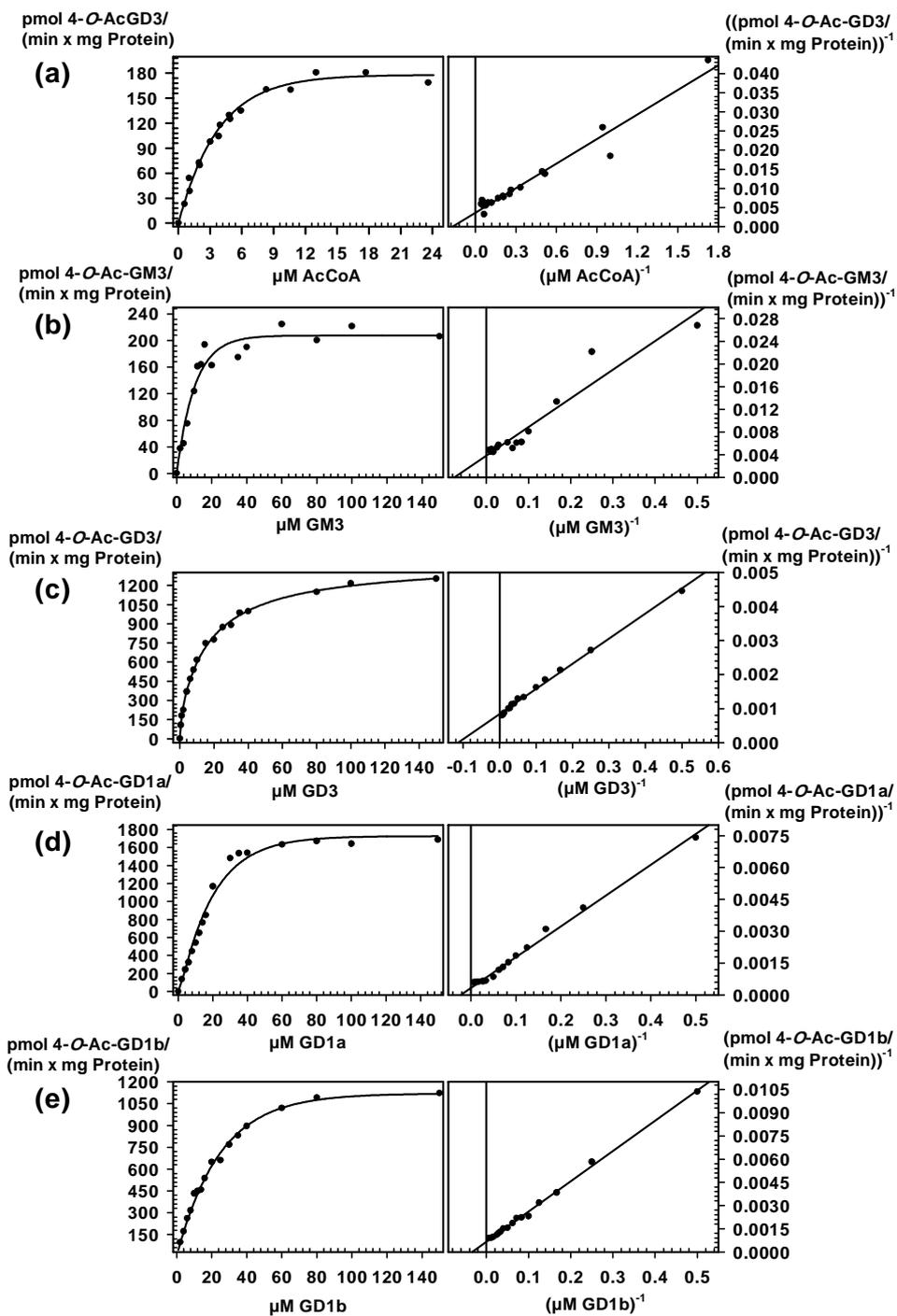


Abbildung 39: Graphen zur Auswertung der Michaelis-Menten-Kinetik

Auf der linken Seite ist der direkte Auftrag, auf der rechten der reziproke Auftrag dargestellt. Es wurden die kinetischen Parameter der fünf Substrate AcCoA (a), GM3 (b), GD3 (c), GD1a (d) und GD1b (e) bestimmt (vgl. dazu Tabelle 3 und \uparrow 2.2.5.12.1).

Da GM3 kein allzu passendes Substrat darstellte (vgl. Abbildung 18), streuten die ermittelten Meßwerte stark, wohingegen sich alle anderen Substrate durch eine stete Meßwertverteilung auszeichneten. Alle Substrate haben, ausgedrückt durch den K_M -Wert im niederen mikromolaren Bereich, eine hohe Affinität zum Enzym. Die drei getesteten Disialoganglioside (Abbildung 39(c, d, e)) zeigten die größte maximale Geschwindigkeit (V_{max}), unter ihnen war für GD1a der mit Abstand höchste Wert zu verzeichnen. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in der katalytischen Effizienz wider. Für AcCoA (Abbildung 39(a)) konnte bezüglich des membrangebundenen Enzyms mit einem K_M von $0.6 \mu\text{M}$ eine noch höhere Affinität festgestellt werden (IWERSEN *et al.*, 1998). Die katalytische Effizienz lag aber wegen der hier ebenfalls stark verringerten V_{max} im gleichen Bereich wie die der solubilisierten 4-OAT (Tabelle 3).

3.6.10.2 Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten für CoA

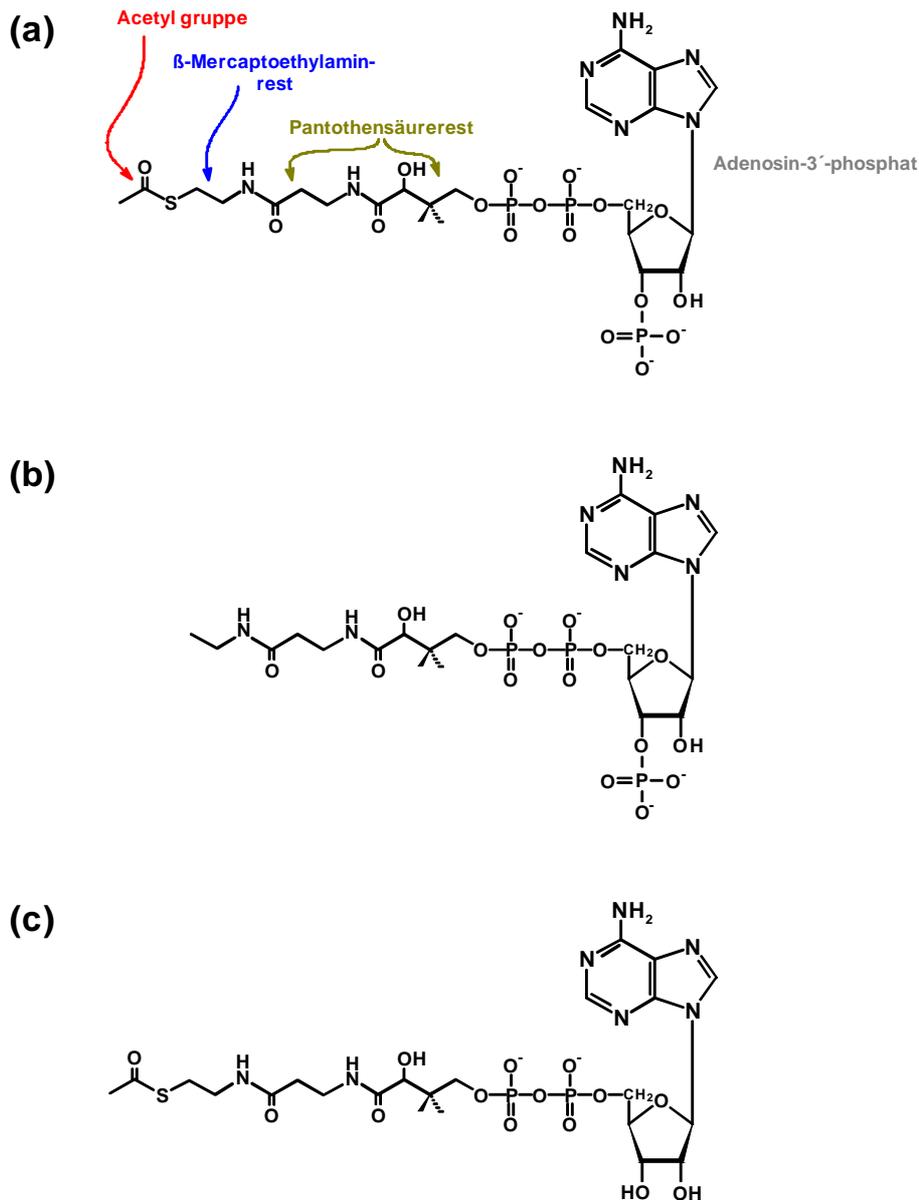


Abbildung 40: Moleküldarstellung der eingesetzten CoA-Derivate

- (a) AcCoA
- (b) Desulfo-CoA
- (c) 3'-Dephospho-CoA

Da das Substrat AcCoA (Abbildung 40) und der hieraus während der enzymatischen Umsetzung gebildete Inhibitor CoA bis auf die Azetylgruppe in ihrer Molekülstruktur identisch sind, war zu erwarten, daß CoA das Enzym kompetitiv hemmen wird. Schon die membrangebundene 4-OAT konnte durch CoA gemischt kompetitiv gehemmt werden. In dieser Weise setzte sich auch das Verhalten der solubilisierten 4-OAT in Inhibitionsstudien mit CoA fort (\uparrow 2.2.5.12.2). CoA inhibierte in diesem Fall die 4-OAT rein kompetitiv, was in der graphischen Darstellung der Inhibitionsgraphen durch den Schnittpunkt der linearisierten reziproken Darstellung auf der

Ordinate eindeutig ist (Abbildung 41). Die Inhibitionskonstante K_i für CoA berechnete sich zu $14.8 (\pm 1.2) \mu\text{M}$.

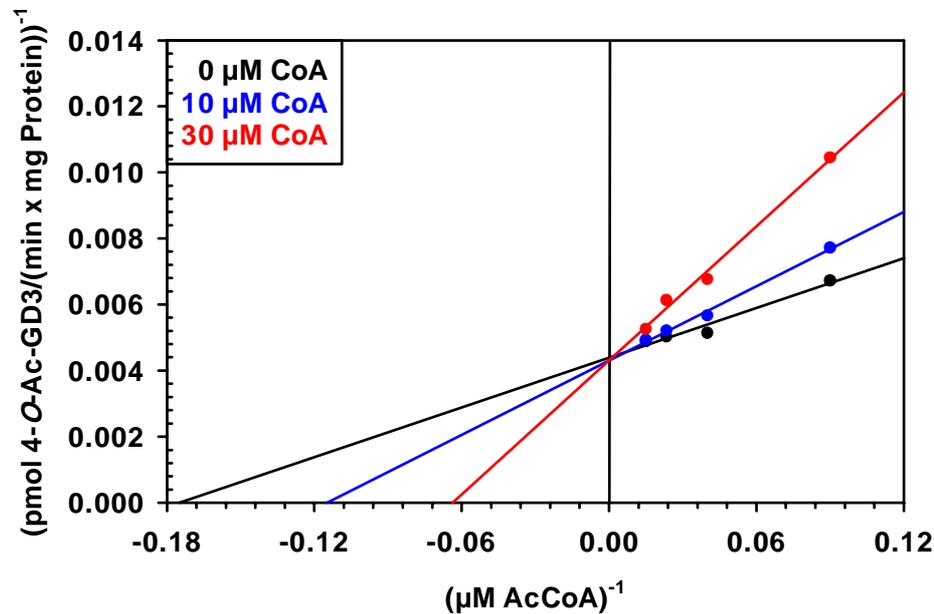


Abbildung 41: Grafik zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Bei jeweils vier AcCoA-Konzentrationen (10, 20, 30 und 40 μM) wurde die 4-OAT-Aktivität in Gegenwart von 0, 10 und 30 μM des Inhibitors CoA bestimmt. Der Schnittpunkt der drei linearisierten Graphen in der reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk in einem Punkt auf der Ordinate verrät eine rein kompetitive Inhibition. Die gemittelte Inhibitionskonstante ergab sich zu 14.8 μM .

3.6.11 Weitere Inhibitionsversuche

3.6.11.1 Inhibitionsversuche mit Desulfo-CoA und 3'-Dephospho-CoA

Mit den beiden CoA-Derivaten Desulfo-CoA und 3'-Dephospho-CoA (Abbildung 40) sollte untersucht werden, ob bestimmte Teile des CoA-Moleküls für die Anbindung an das Enzym essentiell sind (Vgl. dazu auch 3.6.11.2). Desulfo-CoA entpuppte sich als potenter Inhibitor, der schon bei einer 13 μM Konzentration die Enzymaktivität auf die Hälfte hemmte (Abbildung 42).

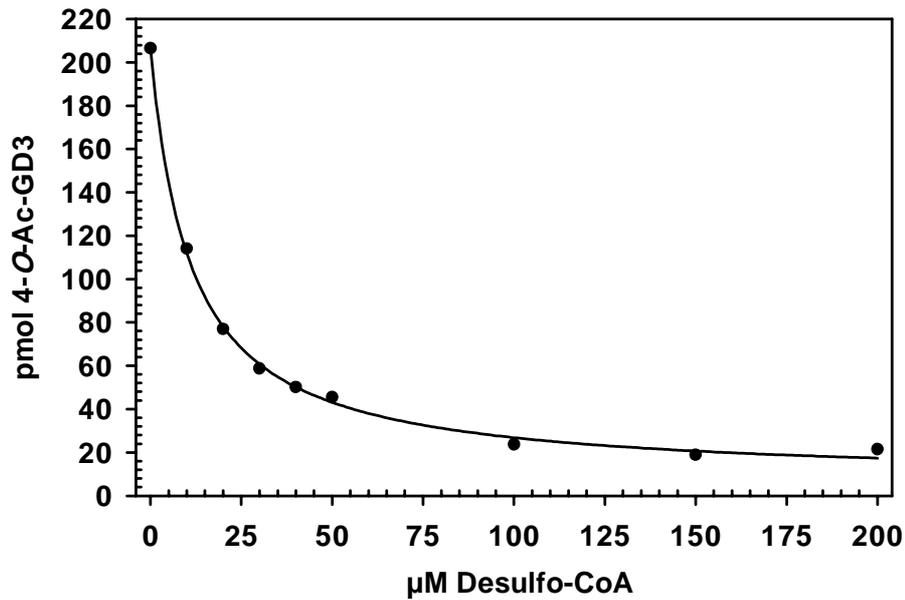


Abbildung 42: Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch Desulfo-CoA

Desulfo-CoA war ein potenter Inhibitor, wenn auch nicht ganz so effektiv wie CoA. Bei einer Konzentration von 13 μM Desulfo-CoA wurde die 4-OAT zu 50 % inhibiert.

Dagegen zeigte 3'-Dephospho-CoA einige bemerkenswerte Besonderheiten über seine 50 %ige Inhibition bei einer 22 μM Konzentration hinaus (Abbildung 43).

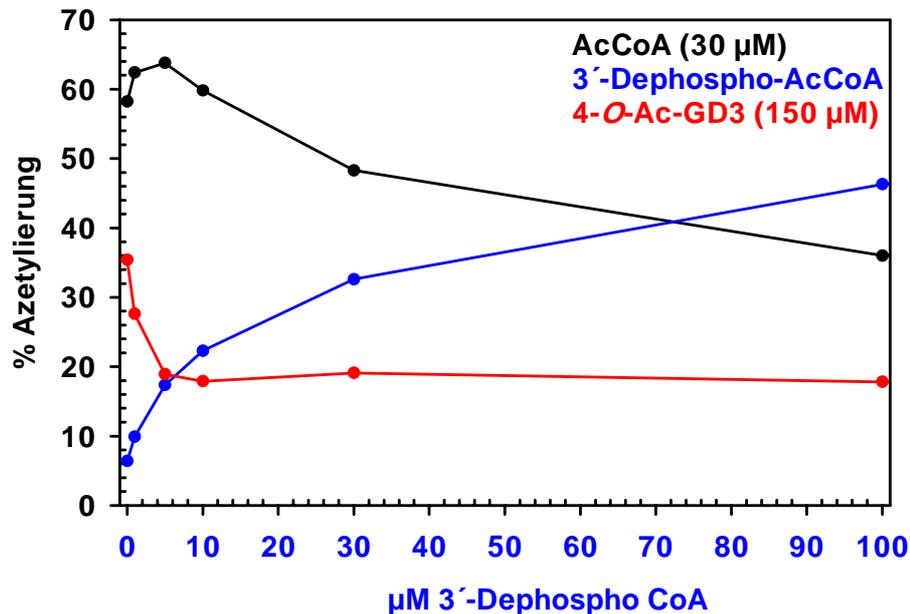
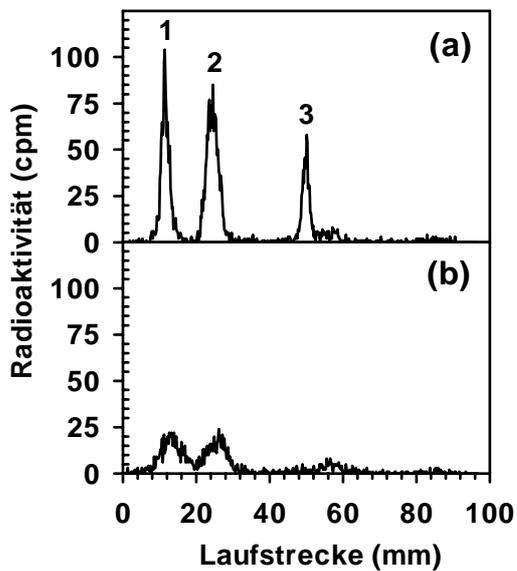


Abbildung 43: Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch 3'-Dephospho-CoA

Die Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch 3'-Dephospho-CoA war bemerkenswert. Bei steigender Zugabe des Inhibitors wurde die 4-O-Ac-GD3-Synthese bis zu einem Wert von 50 % inhibiert, während der Inhibitor wahrscheinlich S-azetyliert wurde. Darüberhinaus blieb die 4-O-Ac-GD3-Konzentration konstant und die Azetylierung des Inhibitors verlief ausschließlich auf Kosten des Substrats AcCoA. Die Konzentration des azetylierten Inhibitors strebte dabei einem Sättigungswert entgegen.

Die Inhibition der 4-O-Ac-GD3-Bildung führte bei Erhöhung der 3'-Dephospho-CoA-Konzentration nicht über 50 % hinaus, sondern blieb konstant bei diesem Wert. Stattdessen wurde der Inhibitor in einer enzymatischen Konkurrenzreaktion zuerst auf Kosten von 4-O-Ac-GD3 azetyliert, später dann aber auf Kosten von AcCoA, während die 4-O-Ac-GD3-Konzentration konstant gehalten wurde. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurde 3'-Dephospho-CoA unter diesen Bedingungen an der Sulfhydrylgruppe azetyliert, da sowohl AcCoA als auch das azetylierte 3'-Dephospho-CoA unter ammoniakalischen Verseifungsbedingungen das gleiche Verhalten zeigten (Abbildung 44).

**Abbildung 44:****Alkalische Verseifung von AcCoA, 3'-Dephospho-AcCoA und 4-O-Ac-GD3**

Alle drei Substanzen lassen sich unter den gleichen Bedingungen alkalisch verseifen.

(a) Vor Verseifung in Ammoniakdampf.

(b) Nach Verseifung in Ammoniakdampf.

Die *O*-Azetylierung von 4-*O*-Ac-GD3 (Peak 3) war am labilsten, die Azetylierung von AcCoA (Peak 1) und dem bisher unbekanntem Produkt (Peak 2) etwas stabiler. Die gleiche Verseifungscharakteristik von AcCoA und dem unbekanntem Produkt sprachen bei letzterem neben den bekannten Fakten für 3'-Dephospho-AcCoA.

Daß die Reaktion enzymatischer Natur war, konnte in weiteren Experimenten bewiesen werden (↑ 2.2.5.13.1). Auch in Abwesenheit von GD3 als Substrat fand die Azetylierungsreaktion statt (Abbildung 45(b)) und wurde durch vorheriges Erhitzen des Enzyms vollständig unterbunden (Abbildung 45(c)). Eine nichtenzymatische Reaktion konnte auch durch nichtenzymatische Inkubation von AcCoA und 3'-Dephospho-CoA unter ansonsten gleichen Bedingungen ausgeschlossen werden (Abbildung 45(d)).

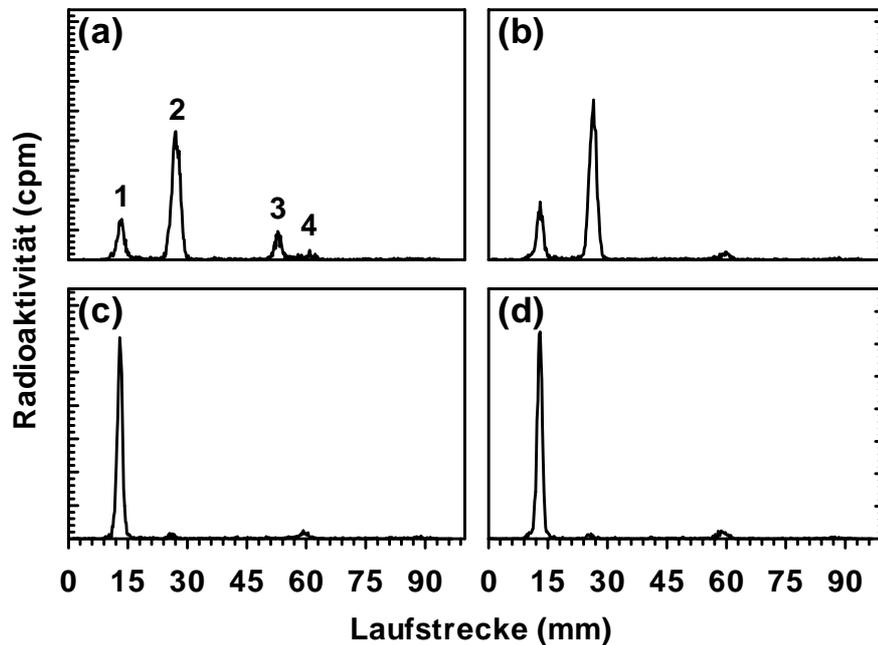


Abbildung 45: Nachweis über die enzymatische Natur der 3'-Dephospho-AcCoA-Bildung

- (a) Kontrollreaktion.
- (b) Inkubation ohne GD3 als Substrat.
- (c) Inkubation mit zuvor erhitztem Enzym.
- (d) Inkubation ohne Solubilisat.

1 = AcCoA

2 = 3'-Dephospho-AcCoA?

3 = 4-O-Ac-GD3

4 = Azetat

Das Interesse an 3'-Dephospho-CoA als Inhibitor wurde durch Inkubation der 4-OAT in Sulfonsäurepuffern (Good-Puffern) geweckt (Abbildung 46).

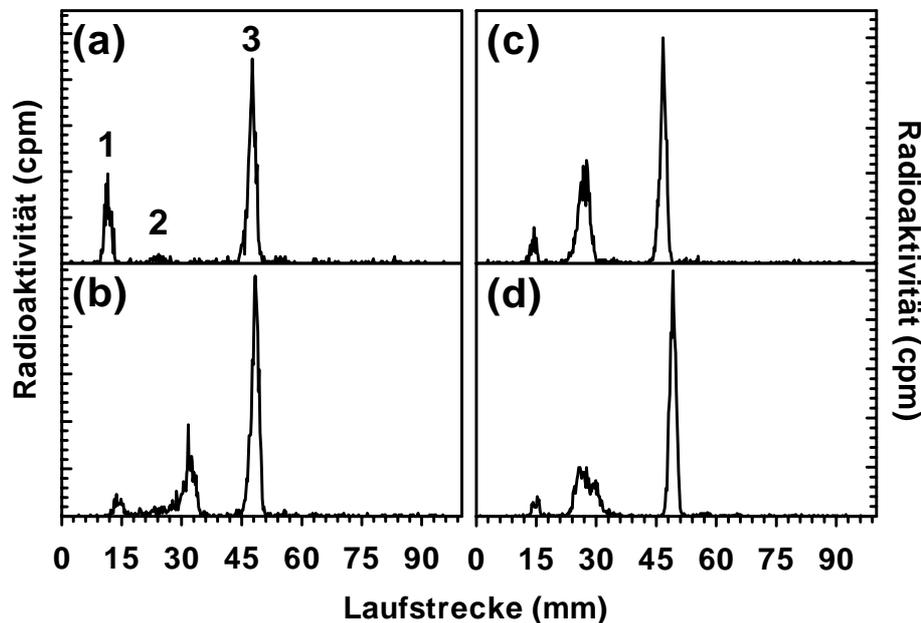


Abbildung 46: Inkubation der solubilisierten 4-OAT in unterschiedlichen Puffern führte zu unterschiedlichen 3'-Dephospho-AcCoA-konzentrationen

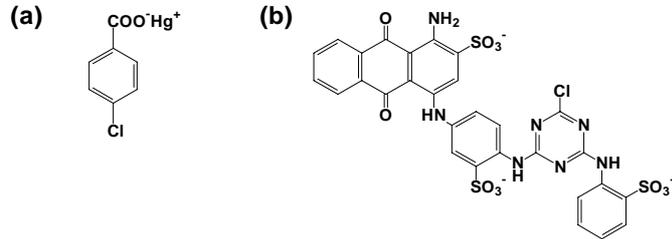
- (a) Kontrollinkubation in Phosphatpuffer
- (b) Inkubation in MOPS-Puffer
- (c) Inkubation in HEPES-Puffer
- (d) Inkubation in MES-Puffer

Während 4-*O*-Ac-GD3 (3) immer in etwa gleicher Menge synthetisiert wurde, wurde überschüssiges AcCoA (1) im Falle der Good-Puffer als Substrat zur Azetylierung von einem bisher unbekanntem Produkt (2) genutzt, das bei Inkubation in Phosphatpuffer nicht gebildet wurde. Nach den bisherigen Erkenntnissen handelte es sich bei dem unbekanntem Produkt um 3'-Dephospho-AcCoA.

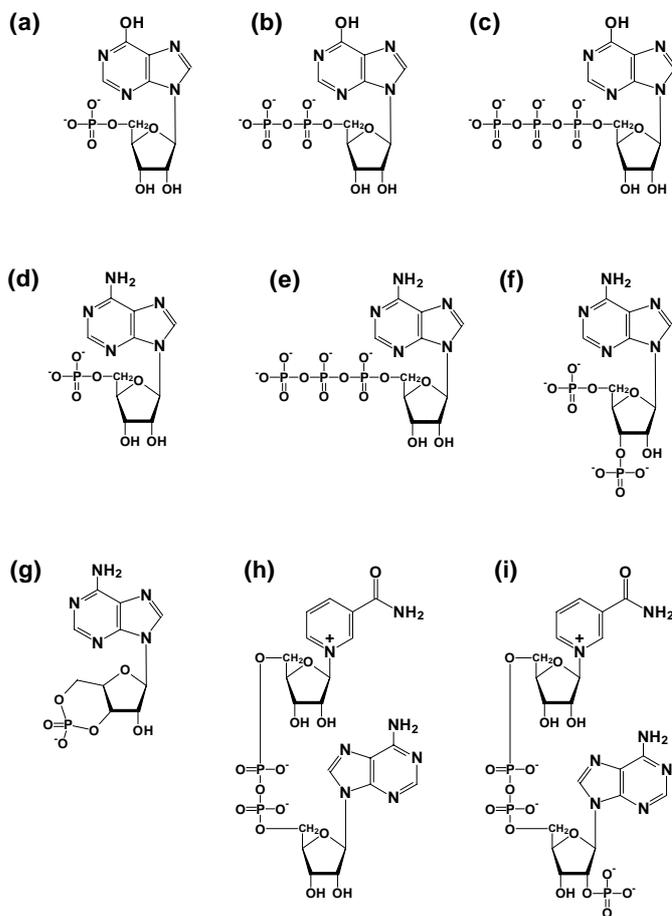
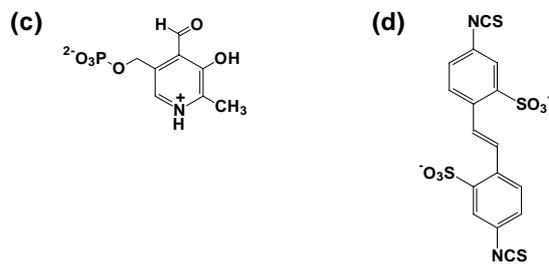
In diesen Puffern (HEPES, MES und MOPS) konnte neben dem gewünschten Produkt 4-*O*-Ac-GD3 noch ein anderes Produkt nachgewiesen werden (Abbildung 46(2)). Da dieses Nebenprodukt auch in Abwesenheit von GD3 auftrat, wurde von einem 4-*O*-Ac-GD3-Spaltprodukt abgesehen. Stattdessen war eine Herkunft aus dem Azetyldonor AcCoA wahrscheinlicher. Weil diese Substanz außerdem bei einer Inkubation der 4-OAT in Phosphatpuffer nicht oder nur in untergeordnetem Maße beobachtet wurde, bedeutete dies im Rückschluß, daß Phosphationen als Inhibitor dieser enzymatischen Nebenreaktion fungierten. Folglich könnte es sich bei dem Enzym um eine Phosphatase handeln, die AcCoA teilweise oder ganz dephosphoryliert. Mit *S*-azetyliertem 3'-Dephospho-CoA scheint das Nebenprodukt nun korrekt identifiziert zu sein.

3.6.11.2 Inhibition durch verschiedene Nukleotide und andere Verbindungen

Weiterhin wurde versucht, die 4-OAT durch andere Inhibitoren zu charakterisieren (\uparrow 2.2.5.13.4, Abbildung 47).

**Abbildung 47:****Nicht-nukleotidische Inhibitoren**

- (a) *p*-CMB
- (b) F3G-A
- (c) PLP
- (d) DIDS

**Abbildung 48:****Purinnukleotide als Inhibitoren**

- (a) IMP
- (b) IDP
- (c) ITP
- (d) AMP
- (e) ATP
- (f) 3',5'-ADP
- (g) c-AMP
- (h) NAD⁺
- (i) NADP⁺

Wie schon früher nachgewiesen (IWERSEN *et al.*, 1998), war das für Disulfidbrückenbindungen hochaffine *p*-CMB (Abbildung 47(a)) ein potenter irreversibler Inhibitor, der die 4-OAT-Aktivität bei einer 1 mM Konzentration vollständig unterband. Dies ist ein klarer Hinweis auf im Enzym vorhandene funktionelle Disulfidbrücken. Der häufig in Affinitätschromatographien für nukleotidabhängige Enzyme als Ligand eingesetzte Triazinfarbstoff Cibacron Blue F3G-A (Abbildung 47(b)) (LOWE und PEARSON, 1984; STELLWAGEN, 1990) inhibierte im hohen mikromolaren Bereich. Da das Molekül verschiedene funktionelle Gruppen besitzt, ist seine Wirkung allerdings nicht definierbar. Auch sein Einsatz in der Affinitätschromatographie (\uparrow 3.8.1.1) ist rein empirischer Natur. Ein drittes Nicht-Nukleotid-Substrat ist das Coenzym PLP (Abbildung 47(c)), das an vielen biochemischen Reaktionen beteiligt ist, wie zum Beispiel der phosphorylytischen Spaltung von Glykogen (KLEIN und HELMREICH, 1985) oder den Transaminierungsreaktionen (STRYER, 1994). PLP wird gelegentlich auch als Inhibitor für Anionentransportvorgänge eingesetzt (SPIRO und SPIRO, 1985) und inhibierte die 4-OAT in 1 mM Konzentration zu etwa 75 %. Da PLP eine freie Aldehydgruppe trägt, könnte die Inhibition aber auch unspezifisch auf der Bildung Schiffscher Basen (Iminen) beruhen. Andere in diesem Test eingesetzte Inhibitoren waren die Purinnukleotide AMP, ATP, 3',5'-ATP, IMP, IDP, ITP, NAD und NADP (Abbildung 48). Alle Nukleotide wurden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zyklisches AMP, NAD⁺ und NADP⁺ hatten neben AMP und ATP den geringsten inhibitorischen Effekt. Während *c*-AMP und die niedriger phosphorylierten Verbindungen überhaupt nicht inhibierten, inhibierte NADP⁺ die 4-OAT-Reaktion zu etwa 20 %, ATP zu etwas mehr als 20 %. Die Inosinnukleotide IMP, IDP und ITP, die sich zu den entsprechenden Adenosinanaloga nur durch eine Hydroxylgruppe anstatt einer Aminogruppe an Position 1 unterscheiden, hemmten in der angegebenen Reihenfolge zu 16, 30 und 58 %. Anscheinend waren sowohl die 1-Hydroxylierung, in intensiverem Ausmaß, als auch der Grad der *O*-Phosphorylierung in 5'-Position ausschlaggebend. Dagegen war der dem in AcCoA am nächsten kommende Nukleotidanteil, das 3',5'-ADP am wirkungsvollsten. Es hemmte die 4-*O*-Azetylierung zu mehr als 80 %, was bewies, daß auch die Phosphorylierung an C-3'-OH von großer Bedeutung ist (Abbildung 49).

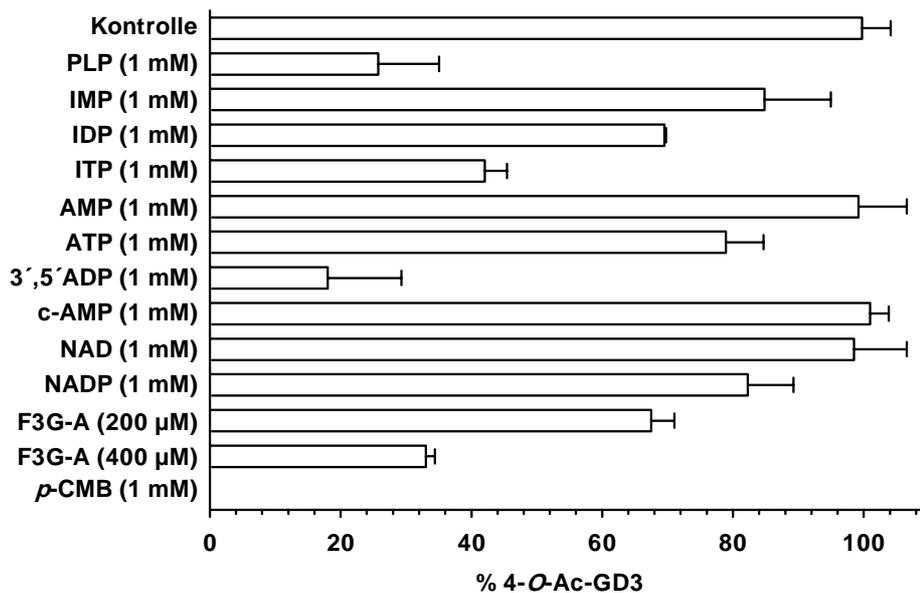


Abbildung 49: Vergleich verschiedener eingesetzter Inhibitoren

Neben *p*-CMB, PLP und F3G-A, deren Effekte als eher unspezifisch einzustufen waren, konnten die Inosinphosphate in der Reihe steigender Phosphorylierung, vor allen Dingen aber 3',5'-ADP überzeugen, das als Nukleotidbestandteil des AcCoA-Moleküls fungiert.

3.6.11.3 Mit 4,4'-Dithioisocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS)

DIDS (Abbildung 47) wurde unter anderem als Inhibitor der Zuckernukleotidtransportprozesse in den Golgi-Apparat eingesetzt (CAPASSO und HIRSCHBERG, 1984; SPIRO und SPIRO, 1985; MILLA *et al.*, 1992). Für die solubilisierte 4-OAT konnte ebenfalls eine Inhibition des Enzyms bei DIDS-Konzentrationen im mittleren bis unteren mikromolaren Bereich beobachtet werden (↑ 2.2.5.13.3, Abbildung 50).

Es konnte gezeigt werden, daß 125 µM DIDS eine 50 %ige Inhibition zur Folge hatte. Die Inhibition mochte aber auch in diesem Fall unspezifisch durch die Sulfonsäure- und Isothiocyanatfunktionen im Molekül verursacht worden sein.

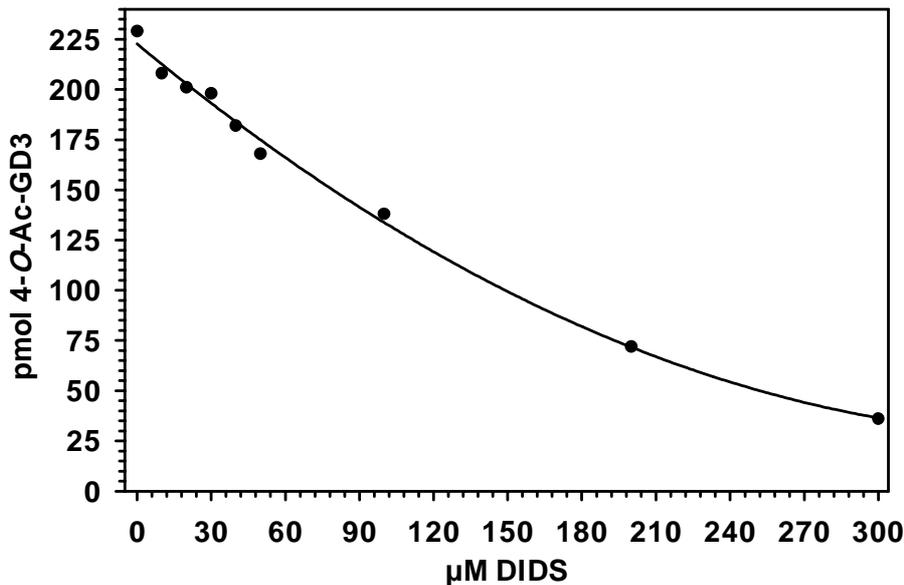


Abbildung 50: Inhibition der solubilisierten 4-OAT durch DIDS

DIDS inhibierte die solubilisierete 4-OAT erst bei einer Konzentration von 125 μM zu 50 %. Insgesamt konnte DIDS nicht als potenter Inhibitor angesehen werden. Die Inhibition basierte wahrscheinlich nicht auf spezifischen Effekten.

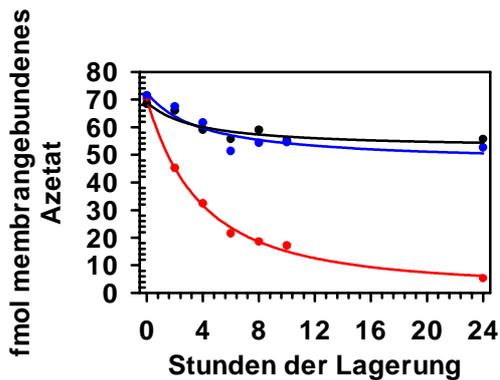
3.6.11.4 Mit Laktosylceramid

Wenn AcCoA-Derivate als Inhibitoren fungieren konnten, so war es eventuell möglich, daß auch eine Inhibition durch Derivate des zweiten Substrats, des Gangliosids verursacht wird. Aus diesem Grunde wurde Laktosylceramid, das Grundgerüst aller eingesetzten Ganglioside, auf seine inhibitorische Wirkung getestet (\uparrow 2.2.5.13.5). Interessanterweise erwies sich Laktosylceramid als Inhibitor vollkommen wirkungslos.

3.6.12 Stabilitätstests

3.6.12.1 Stabilität des membrangebundenen Enzyms bei drei Temperaturen

Es stellte sich heraus, daß das membrangebundene System bei 0 °C und 4 °C über 24 h nur etwa 20 % seiner Aktivität verlor, dagegen bei 25 °C schon nach 4 h mehr als 50 % und nach 24 h vollständig (Abbildung 51).

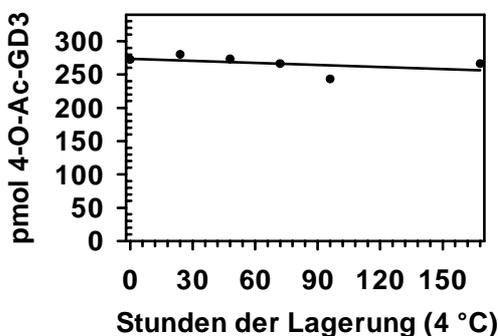
**Abbildung 51:****Temperaturstabilität der membrangebundenen 4-OAT**

Auffallend war die Instabilität des Enzyms bei 25 °C. Nach einem Tag Lagerung war praktisch keine Enzymaktivität mehr meßbar. Dagegen ließ sich das Enzym bei Kühlraumtemperatur zumindestens über 24 h lang gut lagern.

rote Kurve : 25 °C
 schwarze Kurve : 4 °C
 blaue Kurve : 0 °C

3.6.12.2 Stabilität des solubilisierten Enzyms bei 4 °C

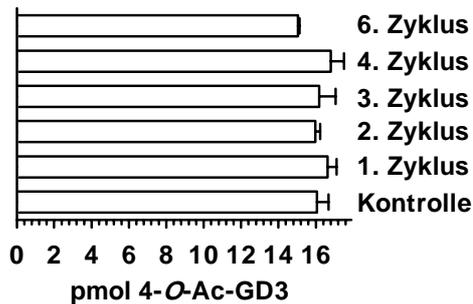
Für die solubilierte 4-OAT wurde aufgrund der routinemäßig bei 4 °C durchzuführenden Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte eine Langzeitstabilitätsmessung bei 4 °C betrachtet. Das Enzym war nach 1 Woche der Lagerung bei dieser Temperatur noch immer so aktiv, wie ein frischzubereitetes Enzymsolubilisat (Abbildung 52).

**Abbildung 52:****Temperaturstabilität der solubilisierten 4-OAT**

Das solubilierte Enzym war selbst nach einer Woche Kühlraumlagerung unverändert aktiv.

3.6.12.3 Stabilität des solubilisierten Enzyms gegenüber Frier-Tau-Zyklen

Ob das frisch solubilierte Enzym zur längeren Lagerung bei –80 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden durfte, sollte in diesem Experiment überprüft werden (↑ 2.2.5.14.3). Die solubilierte 4-OAT erwies sich selbst nach 6 Frier- und Tau-Zyklen immer noch so aktiv wie die frischbereitete Enzymlösung (Abbildung 53).

**Abbildung 53:****Stabilität der solubilisierten 4-OAT gegenüber Frier-Tau-Zyklen**

Selbst nach sechsmaligem Einfrieren und Auftauen war das Enzym unverändert aktiv. Eine Lagerung des Enzyms durch Einfrieren ist entsprechend empfehlenswert.

3.6.12.4 Des solubilisierten Enzyms gegenüber Lyophilisation

Als eine Alternative gegenüber der Lagerung des Solubilisats bei -80 °C wurde überprüft, ob das Solubilisat nach Lyophilisation und Wiederauflösen noch aktiv war (↑ 2.2.5.14.4). In der Tat konnte das solubilierte Enzym durch Lyophilisation ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

3.6.12.5 Einfluß anderer Substanzen auf die 4-OAT-Aktivität

Glycerin, Saccharose und Sulfhydrylgruppen enthaltende Substanzen wie DTT, 2-Mercaptoethanol oder 2-Mercaptoethanolamin werden gerne zur Stabilisierung von Enzymen gerade während ihrer Aufreinigung eingesetzt. Wie Abbildung 54 zu entnehmen ist, war nur DTT ein inhibierendes Agenz und Saccharose aktivitätssteigernd. Alle anderen Agenzien übten keinen Einfluß aus und eignen sich entsprechend für zukünftige Enzymreinigungsansätze. Da EDTA zu keiner Aktivitätsabnahme führte, konnte davon ausgegangen werden, daß zwei- oder dreiwertige Metallkationen für die 4-OAT nicht essentiell waren.

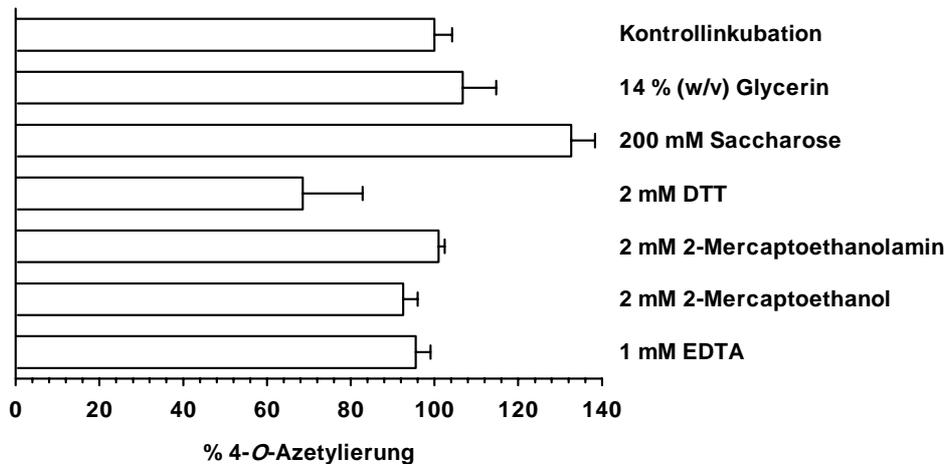


Abbildung 54: Einfluß enzymstabilisierender Zusätze

Bis auf DTT hatte keiner der Zusätze eine signifikant inhibierende Wirkung, mit 200 mM Saccharose erhöhte sich die Enzymaktivität sogar um mehr als 20 %. EDTA, das zwei- und dreiwertige Metallkationen bindet, hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, so daß auch dieses Experiment keine Beteiligung solcher Kationen an der Enzymaktivität untermauert.

3.6.13 Ultrafiltrierbarkeit der solubilisierten 4-OAT

Im Hinblick auf eine spätere Enzymreinigung war es unerlässlich, zu überprüfen, ob sich das gelöste Enzym durch Ultrafiltration anreichern ließ (\uparrow 2.2.5.15). Dazu wurde das Solubilisat über Membranen mit einem MWCO von 30 kDa ultrafiltriert. Membranen mit einem MWCO von 10 kD waren für größere Mengen der Konzentrierung sehr schlecht geeignet, da das Detergenz CHAPS aufgrund seiner Aggregationszahl (AN) von 4-14 (NEUGEBAUER, 1990) Mizellen mit einem Molekulargewicht von zum Teil größer als 10 kDa bildet und sich das Detergenz bei der Ultrafiltration stark aufkonzentrieren würde. Dagegen lag die molekulare Ausschlußgrenze von 30 kDa gerade über dem mittleren mizellaren Molekulargewicht. Das Ergebnis der Ultrafiltration war überraschend, da weder im Filtrationsrückstand noch im Ultrafiltrat eine Enzymaktivität meßbar gewesen war (Abbildung 55(a,b)). Folgende zwei Situationen konnten eingetreten sein: Entweder wurde das Enzym bei der Ultrafiltration durch die chemisch-physikalische Beschaffenheit der Membran irreversibel zerstört oder durch die Trennung des Enzyms in Untereinheiten bzw. die Abtrennung eines Co-Faktors inaktiviert. Die letztere Möglichkeit wurde überprüft, indem das Ultrafiltrat mit dem Ultrafiltrationsrückstand wieder vereint und dann die Enzymaktivität erneut kontrolliert wurde. Das Unerwartete trat ein, und die Enzymaktivität konnte fast vollständig wiedergefunden werden (Abbildung 55(d)). Darüberhinaus wurden Ultrafiltrat und Rückstand jeweils auf 95 °C erhitzt und nach Abkühlen mit nicht erhitztem

Rückstand bzw. Ultrafiltrat vereint und die Enzymaktivität gemessen. Es konnte klargelegt werden, daß der Ultrafiltrationsrückstand hitzeinaktivierbar war, das Ultrafiltrat jedoch nicht (Abbildung 55(e,f)). Dieses Ergebnis war konform mit der Annahme, das Enzym befände sich im Filtrationsrückstand. Dabei blieb die Natur des durch Hitze nicht zerstörbaren Co-Substrats ungeklärt.

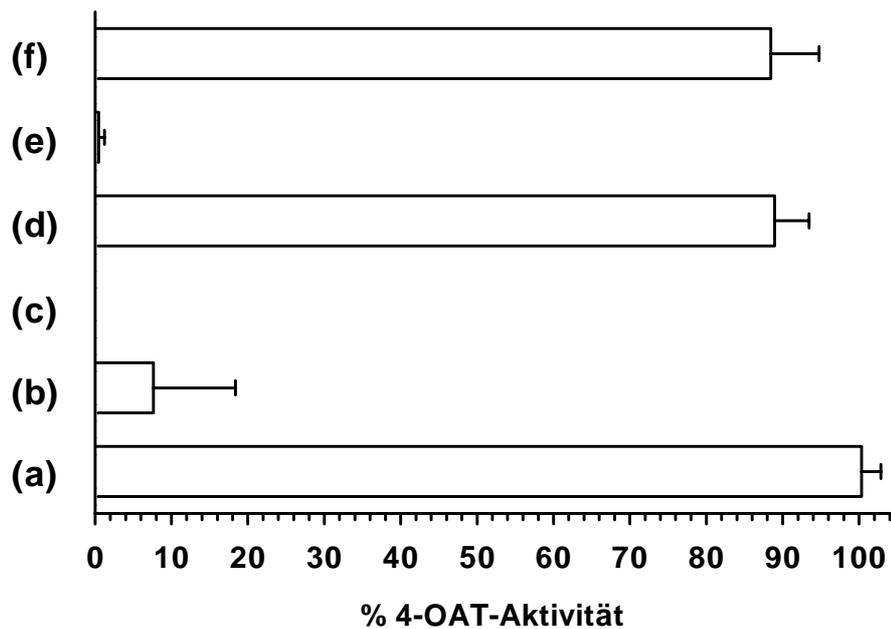


Abbildung 55: 30 kDa-Ultrafiltration der solubilisierten 4-OAT

- (a) Kontrollinkubation ohne Ultrafiltration.
- (b) Inkubation des Ultrafiltrationsrückstands.
- (c) Inkubation des Ultrafiltrats.
- (d) Inkubation des wiedervereinten Ultrafiltrationsrückstands und -filtrats.
- (e) Inkubation des wiedervereinten Ultrafiltrationsrückstands und -filtrats nach Hitzebehandlung des Ultrafiltrationsrückstands.
- (f) Inkubation des wiedervereinten Ultrafiltrationsrückstands und -filtrats nach Hitzebehandlung des Ultrafiltrats.

3.6.14 Testen verschiedener Substanzen als potentielle Co-Faktoren

Alle unter 2.2.5.18 genannten Substanzen regenerierten die Enzymaktivität in der 30 kDa-ultrafiltrierten 4-OAT nicht. Weil keine dieser Komponenten eine Co-Faktoreigenschaft zeigte, waren die Substanzen nicht von weiterem Interesse.

3.6.15 Co-Faktorabhängigkeit der solubilisierten 4-OAT

Wäre die 4-OAT von einem Co-Faktor abhängig, dann würde das Enzym bezüglich dieses Co-Faktors auch ein Sättigungsverhalten zeigen. Um diese Mutmaßung zu überprüfen, wurde Solubilisat über eine Sepak™-Chromatographie angereichert und dabei als wasserlösliche Substanz identifiziert (↑ 2.2.5.16). Lipide als Co-Faktoren in weiteren Betrachtungen schieden daher aus. Das bei dieser Reinigung erhaltene Lyophilisat wurde als konzentrierte Lösung neu angesetzt und dem Enzymtestansatz beigemischt. Als Ergebnis konnte tatsächlich eine Sättigung der 4-OAT durch den Co-Faktor beobachtet werden (Abbildung 56).

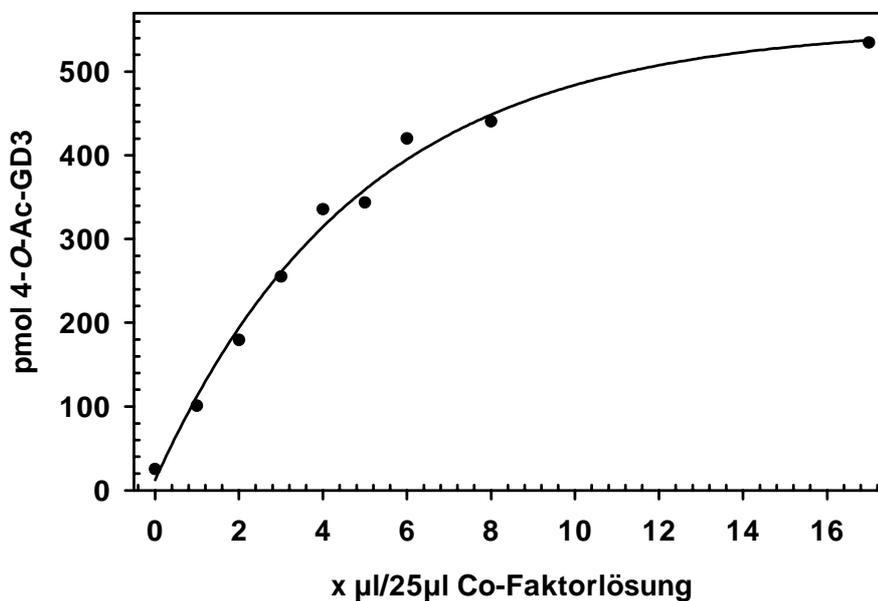


Abbildung 56: Sättigung der 4-OAT durch den Co-Faktor

Durch Erhöhung der Co-Faktorkonzentration im Inkubationsansatz konnte gezeigt werden, daß für diese Substanz ein Sättigungswert besteht, eine für Co-Faktoren notwendige Eigenschaft.

3.7 Weitere Untersuchungen

3.7.1 Präparation des GD3-Tetrasaccharids Neu5Ac(α 2,8)Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc

Das durch Ozonolyse und β -Eliminierung aus GD3 abgespaltene Tetrasaccharid wurde durch Ultrafiltration und Gelfiltration von Lipiden und Nebenprodukten befreit und auf DC analysiert (↑ 2.2.1.10). Als störendes Nebenprodukt wurde Neu5Ac erkannt, daß schon unter schwach aziden Bedingungen aus seiner α 2,8-Bindung zu Neu5Ac gelöst wird. Nach Refraktionierung wurde ein chromatographisch reines Produkt isoliert, das ein zu Neu5Ac und α 2,3-SL unterschiedliches Laufverhalten aufwies (Abbildung 57).

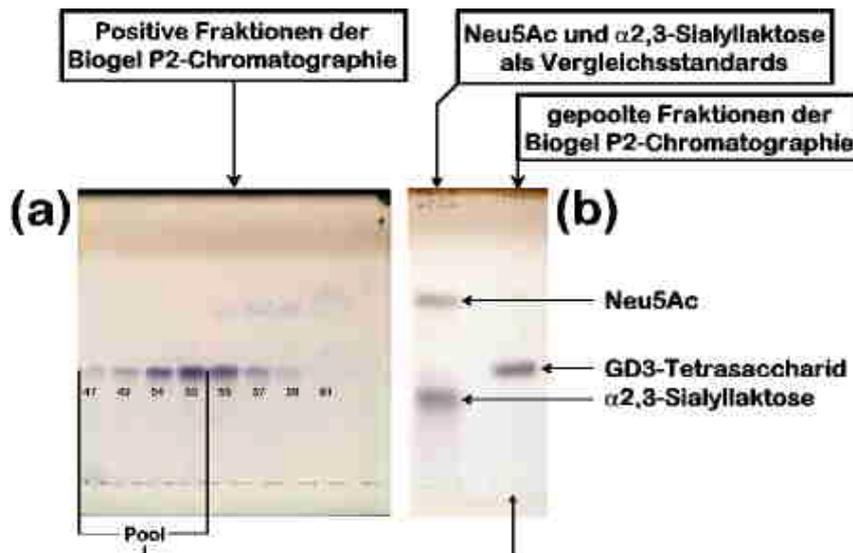


Abbildung 57: DC-Analyse des Tetrassaccharids Neu5Ac(α 2,8)Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc während der Fraktionierung und nach endgültiger Reinigung

Abbildung (a) zeigt die positiven Fraktionen während der Biogel P2-Chromatographie. Nur die Fraktionen 47 bis 53 wurden gepoolt, um Neu5Ac als Verunreinigung zu vermeiden. Die Fraktionsnummern sind unter den Banden vermerkt. Abbildung (b) zeigt die Analyse des isolierten Produkts im Vergleich zu Neu5Ac und α 2,3SL.

Auch in der photometrischen Quantifizierung ließen sich der theoretische und experimentell ermittelte Neu5Ac-Gewichts-%-Anteil im Tetrassaccharid zur Deckung bringen:

MW des Tetrassaccharids	(freie Säure, g/mol)	:	937.0
MW von Neu5Ac	(freie Säure, g/mol)	:	309.3
Eingesetzte Tetrassaccharidmenge	(durch Wägung)	:	13.0 μ g (13.9 nmol)
Neu5Ac-Menge	(photometrisch)	:	7.9 μ g (25.5 nmol)
Neu5Ac-Gew.-%	(experimentell)	:	61 (\pm1) %
(Neu5Ac-Gew.-%)	(theoretisch)	:	64 %

3.7.2 Hydrolyseversuche

Verschiedene Beiträge zu Sia-Hydrolyseverfahren sind über einen längeren Zeitraum erschienen (REUTER und SCHAUER, 1994; VARKI und DIAZ, 1984; MAWHINNEY und CHANCE, 1994; MATTOO und ROSEMAN, 1997). Der Trend entwickelte sich dahin, immer mildere Säuren als Hydrolysemittel der Wahl einzusetzen. Die aktuellste Methode ist derzeit die Hydrolyse mit 2 M Propionsäure (MAWHINNEY und CHANCE, 1994). Ein Problem, was bisher unbeantwortet blieb, ist die Empfindlichkeit der glykosidischen Sia-Bindung gegenüber der Säurehydrolyse in verschiedenen Sialosiden, denn ein Einfluß des Aglykons auf die Effektivität der Hydrolyse muß berücksichtigt werden. Aus diesem Grunde wurde eine Vergleichshydrolyse-

studie mit verschiedenen Säuren und verschiedenen Substraten begonnen, die jedoch noch nicht abgeschlossen ist (\uparrow 2.2.1.7). Trotzdem ist klar zu erkennen, daß verschiedene Sialoside unterschiedlich schnell gespalten werden. Am schnellsten werden erwartungsgemäß Oligosaccharide gespalten. Doch auch bei Mitgliedern der gleichen Glykokonjugatgruppe, wie den Gangliosiden, gibt es beträchtliche Unterschiede, die auf die im gleichen Molekül enthaltenen unterschiedlichen Sia-Bindungsarten (α 2,3 und α 2,8) zurückzuführen sind. Ein für das Thema dieser Arbeit sehr wichtiger Aspekt ist die Stabilität der *O*-Azetylgruppen während einer Hydrolyse. Die Hydrolyse von Sia darf lediglich als ein Versuch der optimalen Gratwanderung zwischen höchstmöglicher Ausbeute und niedrigstem Verlust durch Degradation der Sia selbst oder De-*O*-azetylierung betrachtet werden. In diesem Sinne kommt für Seitenketten-*O*-azetylierte Spezies noch die Tendenz der *O*-Azetylgruppenwanderung von Position 7 über 8 zu 9 erschwerend hinzu (\uparrow 1.4.1). Mehrere für diese Arbeit bedeutende Beispiele seien angeführt. Meerschweinchenserum wurde mit 0.1 M und 0.01 M Salzsäure, 0.5 M Ameisensäure, 2 M Essigsäure und 2 M Propionsäure über verschiedene Zeiträume hinweg bei den angegebenen Temperaturen hydrolysiert (Abbildung 58).

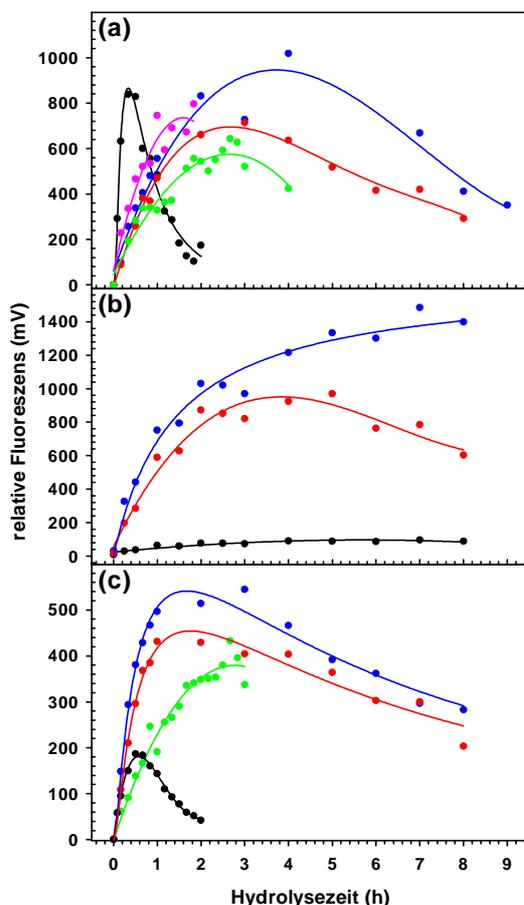


Abbildung 58:

Sia-Ausbeuten bei der Säurehydrolyse von Meerschweinchenserum und Neu4Ac5Gc-GM3 mit verschiedenen Säuren

- (a) Meerschweinchenserum hydrolysiert mit 0.1 M Salzsäure (schwarz), 0.01 M Salzsäure (violett), 0.5 M Ameisensäure (grün), 2 M Essigsäure (rot) und 2 M Propionsäure (blau). Abgebildet ist lediglich die Analyse freier Neu4,5Ac₂.
- (b) Meerschweinchenserum in 20 mM CHAPS hydrolysiert mit 2 M Propionsäure. Die drei abhydrolysierten Sia sind dargestellt: Neu5Ac (blau), Neu4,5Ac₂ (rot) und Neu5Gc (schwarz)
- (c) Neu4Ac5Gc-GM3 hydrolysiert mit den unter (a) genannten Säuren, aber ohne 0.01 M Salzsäure. Abgebildet ist die Analyse von Neu4Ac5Gc.

Die gezeigte Ausbeute an Neu4,5Ac₂ in Abbildung 58(a) ist von Säure zu Säure unterschiedlich und liegt bei der Hydrolyse mit Propionsäure am höchsten, mit der das Optimum erst nach 4 h erreicht wird, einem Wert, der mit dem in der Literatur für Muzine beschriebenen identisch ist (MAWHINNEY und CHANCE, 1994). Eine eventuelle Verbesserung der Zugänglichkeit der Proteine durch CHAPS-Solubilisierung ist für Propionsäure als Agenz nicht zu beobachten gewesen (Abbildung 58(b)). Eine ganz andere Charakteristik zeigten dagegen die Hydrolysekurven von Neu4Ac5Gc-GM3 (Abbildung 58(c)). Bei den vier getesteten Säuren verschob sich das Optimum für die Hydrolyse mit Propionsäure und Essigsäure zu beträchtlich kürzeren Zeiten, während es für Ameisensäure und 0.1 M Salzsäure identisch blieb. Was die Ausbeute von Neu4Ac5Gc betraf, so war die Propionsäure im Vergleich zu den anderen eingesetzten Vertretern die optimale Wahl. Zwei Beobachtungen lassen sich festhalten. Einerseits sind Variabilitäten im Hydrolyseverhalten zwischen den einzelnen Sialosiden zu berücksichtigen, andererseits tauchen selbst Unterschiede während der Hydrolyse ein und desselben Substrates mit verschiedenen Säuren auf. Als Fazit kann im Falle der Nutzung solcher Methoden nur geraten werden, die optimalen Bedingungen durch Vorversuche zu klären. Eine Betrachtung zu der Stabilität *O*-azetylierter Sia ist in der Abbildung 59 und Abbildung 60 zu sehen. Ein relativ einfaches und aus vorherigen Untersuchungen schon vermutetes Bild wird bei der Lagerung von Neu4,5Ac₂ unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen deutlich (Abbildung 59).

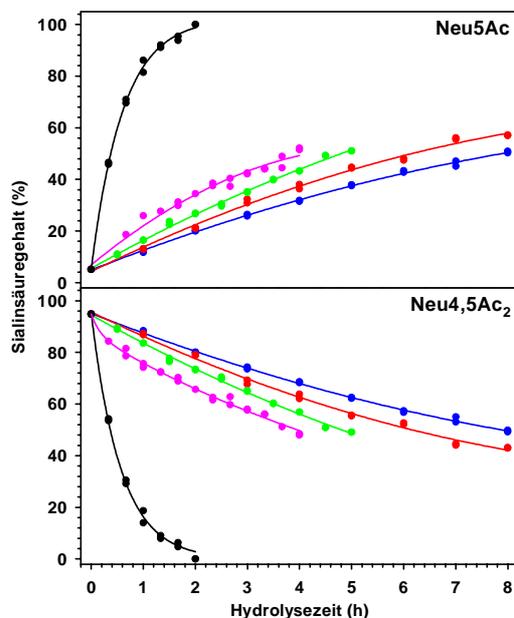


Abbildung 59:

Verhalten von Neu4,5Ac₂ unter säurehydrolytischen Bedingungen

- (a) Steigender Neu5Ac-Anteil während der Hydrolyse mit 0.1 M Salzsäure (schwarz), 0.01 M Salzsäure (violett), 0.5 M Ameisensäure (grün), 2 M Essigsäure (rot) und 2 M Propionsäure (blau).
- (b) Fallender Neu4,5Ac₂-Anteil während der Säurehydrolyse infolge von De-*O*-azetylierung. Die Bedeutung der Farben ist unter (a) nachzulesen.

Propionsäure ist für den Schutz der *O*-Azetylgruppen während der Hydrolyse das Mittel der Wahl. Die 0.1 M Salzsäure ist dagegen die denkbar schlechteste Alternative, de-*O*-azetyliert sie doch schon nach etwa 25 min 50 % der Substanz, was bei Propionsäure erst nach 8 h passiert. In

dem hohen Grad der De-*O*-azetylierung durch 0.1 M Salzsäure muß auch der Grund für die schlechte Maximalausbeute *O*-azetylierte Sia gesehen werden. Die Abstufungen bezüglich der De-*O*-azetylierung zwischen den Säuren des etwa gleichen pH-Wertes (2 bis 2.3) sind indes feiner.

Wurde unter den gleichen Bedingungen Neu5,9Ac₂ betrachtet, so ergab sich ein recht ähnliches Bild (Abbildung 60(a, b)). Interessanterweise konnte hier gerade für die mildere Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure ein Anstieg für die 8-*O*-azetylierte Spezies gezeigt werden. Dies kann nur mit einer *O*-Azetylmigration von Position 9 zu 8 erklärt werden, wenn man eine C-7 zu C-8-Migration ausschließen darf (Abbildung 60(c)). In der Tat war eine 7-*O*-Azetylierung in der betrachteten Probe nur zu einem verschwindend kleinen Betrag enthalten und, sofern die 7-*O*-Azetylierung noch detektiert werden konnte, zeigte sich auch hier ein vorübergehender Anstieg dieser Spezies im gleichen Zeitraum (Abbildung nicht gezeigt).

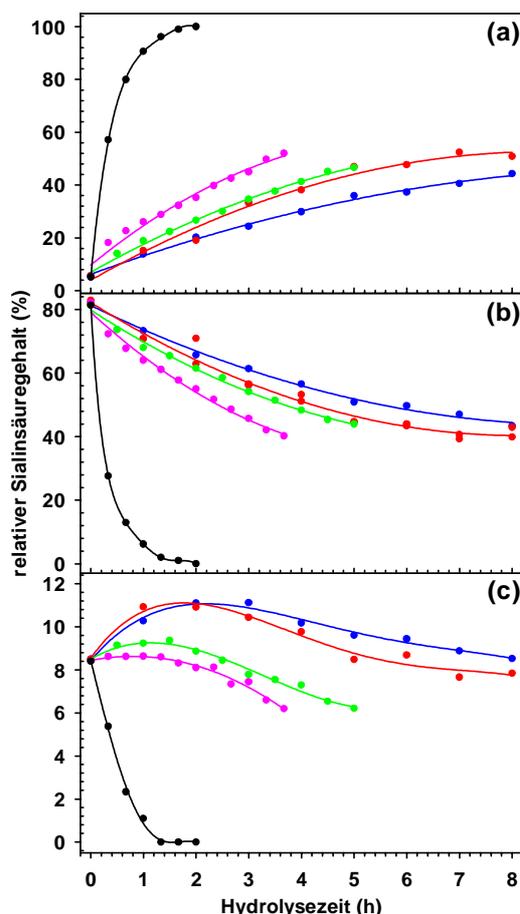


Abbildung 60:

Verhalten eines Gemisches Seitenketten-*O*-azetylierter Sia unter säurehydrolytischen Bedingungen

- (a) Steigender Neu5Ac-Anteil während der Hydrolyse mit 0.1 M Salzsäure (schwarz), 0.01 M Salzsäure (violett), 0.5 M Ameisensäure (grün), 2 M Essigsäure (rot) und 2 M Propionsäure (blau).
- (b) Fallender Neu5,9Ac₂-Anteil während der Säurehydrolyse infolge von De-*O*-azetylierung. Die Bedeutung der Farben ist unter (a) nachzulesen.
- (c) Neu5,8Ac₂-Anteil unter den Hydrolysebedingungen. Auffallend war der Anstieg dieser Komponente kurz nach Beginn der Hydrolyse. Nur 0.1 M Salzsäure zeigte die typische starke De-*O*-azetylierung. Die Bedeutung der Farben ist unter (a) nachzulesen.

3.7.3 Sialinsäurescreening von Meerschweinchenserum, -colon, -milz und -niere

Gibt es ein Gewebe, das einen im Vergleich zum Serum höheren Neu4,5Ac₂-Anteil besitzt? Serumproteine werden zumeist in der Leber gebildet. Bei einem hohen Neu4,5Ac₂-Anteil im Meerschweinchenserum war es deshalb vernünftig in der Leber nach einer 4-OAT zu suchen,

zumal die Leber eines der größten Organe darstellt und sich gut als Enzymquelle eignet. Trotzdem war es interessant zu untersuchen, ob auch andere Organe die gewünschte Sia-Spezies enthielten. Das Ergebnis überraschte in seiner Eindeutigkeit (Abbildung 61).

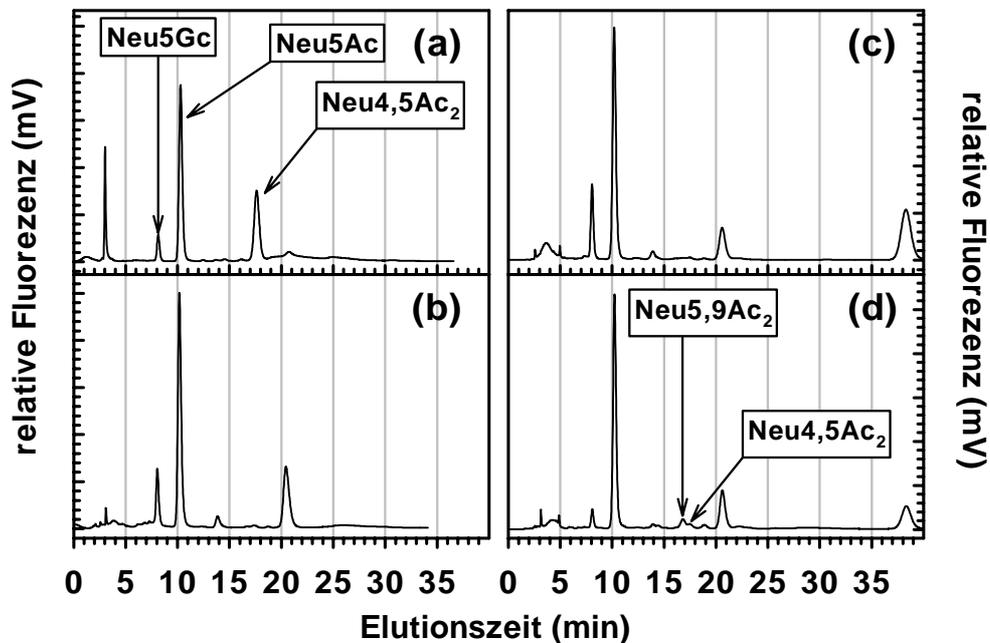


Abbildung 61: Sia-Analyse des Serums und unterschiedlicher Gewebe des Meerschweinchens

(a) Serum, (b) Colon, (c) Milz, (d) Niere.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Serum und Leber enthielten mit Abstand die größte Konzentration Neu4,5Ac₂, wobei in den Golgi-Membranen der Leber der Gehalt noch einmal um 8 % von 10 % auf 18 % stieg. Alle anderen untersuchten Gewebe enthielten nur Spuren oder im Falle der Niere 2 % Neu4,5Ac₂. Die Niere unterschied sich unterdessen von allen anderen Proben durch das Auftreten von Neu5,9Ac₂, einer Sialinsäure, die in den bisherigen Untersuchungen nicht gefunden worden war, die aber der Aussage verschiedener Publikationen nach im Meerschweinchen vorkommen soll. Von Interesse ist hierbei insbesondere die Publikation von Hirabayashi *et al.* (HIRABAYASHI *et al.*, 1983), in der von einem neuen Neu5,9Ac₂-haltigem Hämatosid in der Meerschweinchenniere berichtet wird. Die Gewebe aus Colon und Milz unterschieden sich wiederum durch ihren erhöhten Neu5Gc-Gehalt. Der prozentuale Sia-Gehalt der einzelnen untersuchten Proben ist in Tabelle 4 zusammengestellt:

Tabelle 4: Sialinsäuremuster und prozentualer Sia-Gehalt in verschiedenen Meerschweinchengeweben sowie in Meerschweinchenserum.

Sialinsäure	Blutserum	Leber #	Leber-Golgi-Membranen #	Colon	Milz	Niere
Neu5Ac	58 %	85 %	4 %	84 %	80 %	87 %
Neu5Gc	7 %	5 %	78 %	16 %	19 %	5 %
Neu4,5Ac ₂	35 %	10 %	18 %	< 1 %	< 1 %	2 %
Neu4Ac5Gc	Spuren	∅	∅	∅	∅	∅
Neu5,9Ac ₂	∅	∅	∅	∅	∅	5 %

Die angegebenen Werte sind aus IWERSEN *et al.*, 1998 übernommen.

3.7.3.1 Serum-Neu4,5Ac₂ als 4-OAT-Marker

Die Meerschweinchen wurden von der Pharmakologie der Universität Kiel während zweier Zeitphasen im Jahr benötigt, mehrere Wochen im Mai und Juni und den gleichen Zeitraum im November und Dezember. Sehr oft konnte dabei während der Monate Mai und Juni eine geringe bis keine 4-OAT-Aktivität in der Leber gemessen werden. Im November und Dezember war die Aktivität dagegen sehr hoch. Ob es sich dabei um ein generelles Phänomen oder nur um Zufall handelte, konnte nicht geklärt werden. Für eine empirische Aussage ist die Anzahl der Tiere aus den genannten Zeiträumen zu klein gewesen und Tiere aus dem Mai des Jahres 2000 exprimierten wider Erwarten eine hohe 4-OAT-Aktivität. Um schon im Vorfeld abschätzen zu können, ob eine 4-OAT-Aktivität zu erwarten war, wurde der Neu4,5Ac₂-Gehalt des Serums mit der Aktivität korreliert. Bei einem Neu4,5Ac₂-Gehalt kleiner als 10 % war die entsprechende 4-OAT-Aktivität sehr klein oder nicht mehr vorhanden. Normalerweise lag der Neu4,5Ac₂-Anteil bei den Sia im Blutserum zwischen 30 % und 40 %, wobei auch eine hohe 4-OAT-Aktivität in der Leber zu finden war. Generell wurden deswegen im Vorfeld enzymatischer Untersuchungen 3 µl Serum eines jeden Meerschweinchens einer Sia-HPLC-Analyse unterzogen, die nach 5 h abgeschlossen war. In Abbildung 62 sind exemplarisch paarweise zwei HPLC-Graphen und die dazugehörigen Enzymtestchromatogramme eines Meerschweinchens mit geringem und normalem Serumsialinsäuregehalt zu sehen, die das oben Gesagte vergegenwärtigen.

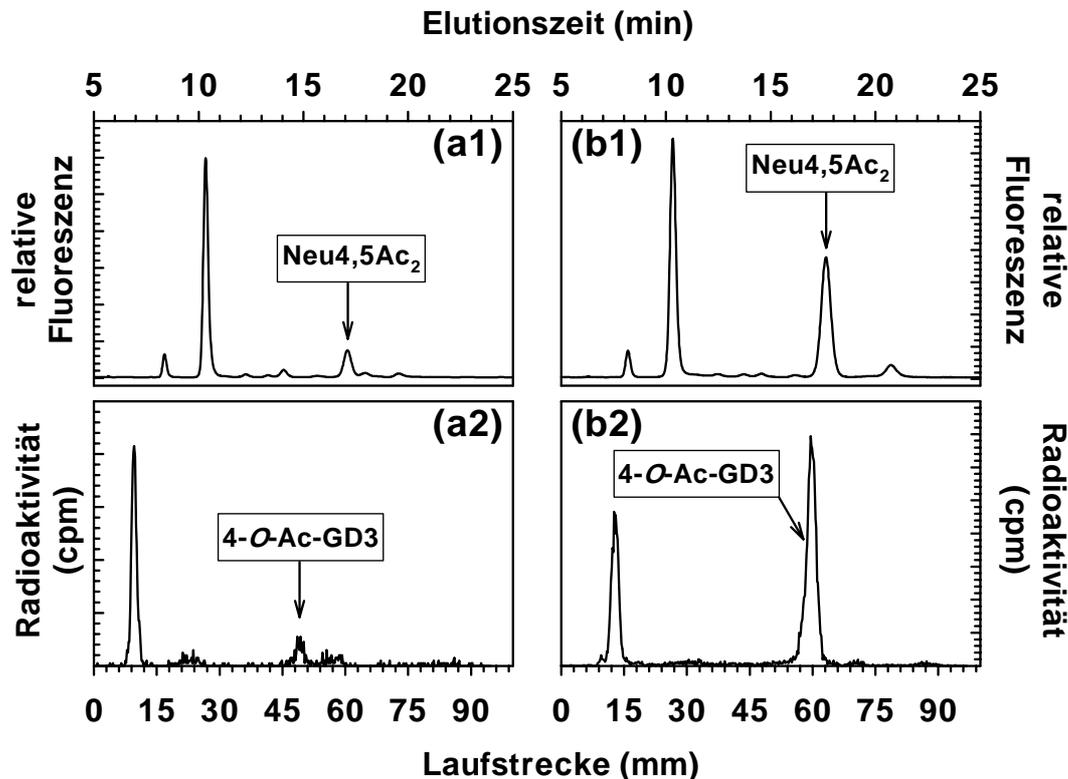


Abbildung 62: Korrelation des Serum-Neu4,5Ac₂-Gehalts mit der 4-OAT-Aktivität im Golgi-Membranensolubilisat

In (a1) konnte ein sehr niedriger Neu4,5Ac₂-Anteil im Serum festgestellt werden. Gleichzeitig war die untersuchte Enzymaktivität (a2) in den Golgi-Membranen verschwindend gering. Ein umgekehrtes Beispiel ist in Abbildung (b) zu sehen. War der Serum-Neu4,5Ac₂-Anteil normal (b1), so konnte auch eine gute 4-OAT-Aktivität gemessen werden (b2).

3.7.4 Gangliosidisolierungen

Ganglioside wurden aus Meerschweinchenleber, -hirn und -serum isoliert und dünnschichtchromatographisch analysiert. Da die Identifikation der Ganglioside anhand der Retentionsfaktoren allein schwierig und nicht alle Standards zum co-chromatographieren vorhanden waren, müssen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, konkrete Ergebnisse schuldig geblieben werden. Die Untersuchungen sind auf diesem Gebiet nicht abgeschlossen und müssen weiter bearbeitet werden. Wichtige Fragen konnten trotzdem geklärt werden. Nach Säurehydrolyse und Sia-HPLC-Analyse (↑ 2.2.1.1, 2.2.2.3.1) war keines der Ganglioside *O*-azetyliert. Dies vereinfacht die zukünftigen Gangliosidreinigungen, da nicht mehr auf die alkalische Verseifung von Phospholipiden, die im weiteren Reinigungsverlauf stets stören, verzichtet werden muß. Meerschweinchenhirn enthielt erwartungsgemäß viele verschiedene Ganglioside in hoher Quantität. Es konnten durch eine HPLC-Präparation (↑ 2.2.2.3.2) (MÜTHING und UNLAND, 1994) drei

Gruppen von Gangliosiden voneinander getrennt werden: Monosialo-, Disialo- und Tri-/Tetrasialoganglioside (Abbildung 63).

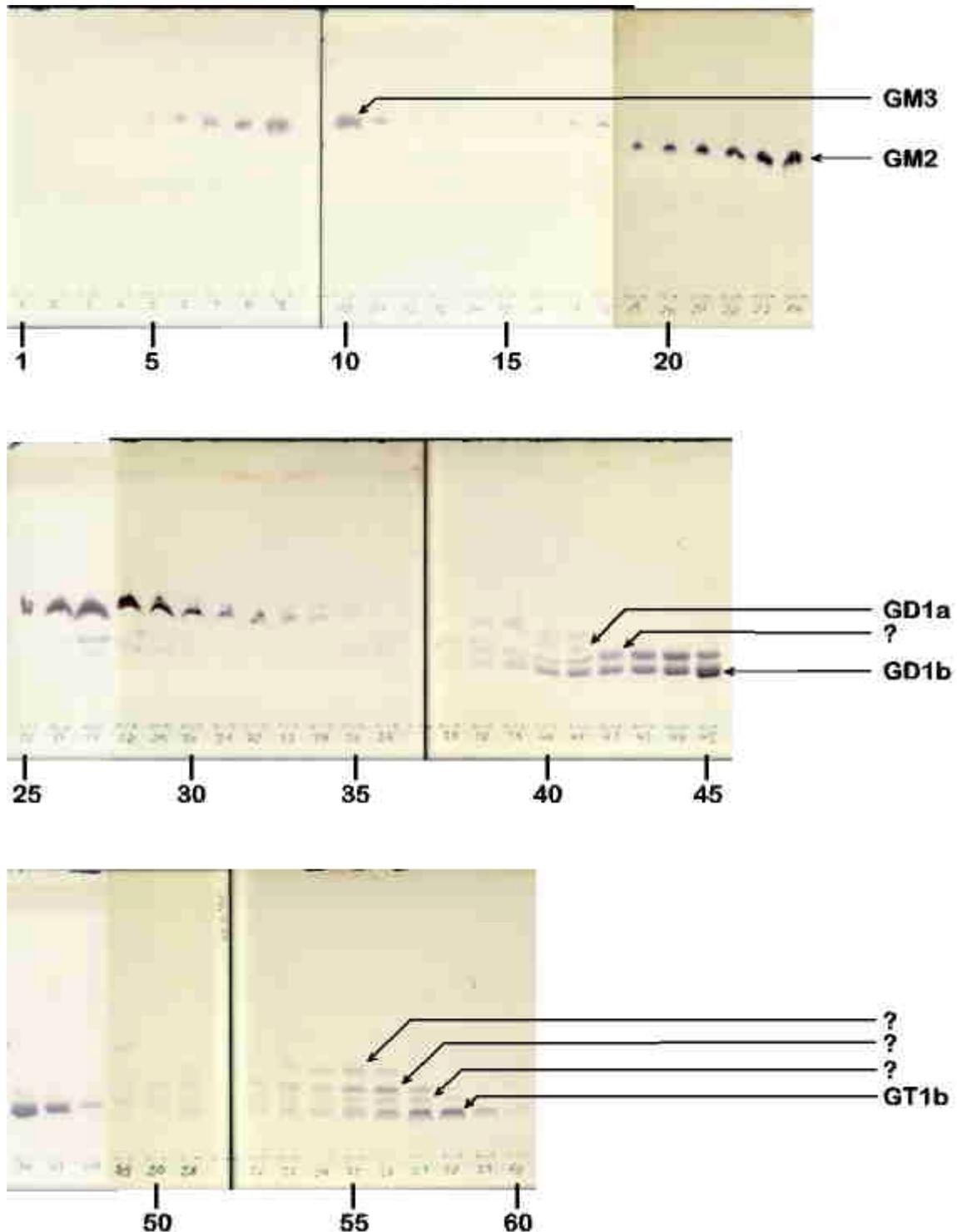


Abbildung 63: Auftrennung isolierter Meerschweinchenhirnganglioside per HPLC

Ganglioside aus Meerschweinchenhirn wurden isoliert und anschließend über Fractogel-TMAE-Anionenaustausch-HPLC in Untergruppen fraktioniert. Durch diese Methode werden Mono-, Di- und Tri-/Tetrasialoganglioside präpariert. Die Banden sind in der Abbildung mit den entsprechend zugeordneten Namen versehen. Fragezeichen kennzeichnen unbekannte Komponenten. Unter den Chromatogrammen sind die Fraktionsnummern indiziert.

Wahrscheinlich handelte es sich um zwei Monosialoganglioside, von denen eines GM3 ist, um drei Disialoganglioside, von denen es sich bei einem um GD1b handelt und um vier Tri- oder Tetrasialoganglioside, unter denen auch GT1b zu sein scheint. Auch der Einsatz als exogene Akzeptoren in Enzymtest 5 deutete auf das Vorhandensein von GT1b und GD1b hin (Abbildung 64(a)). Eine exakte Aufklärung müssen letztendlich massenspektrometrische Untersuchungen erbringen.

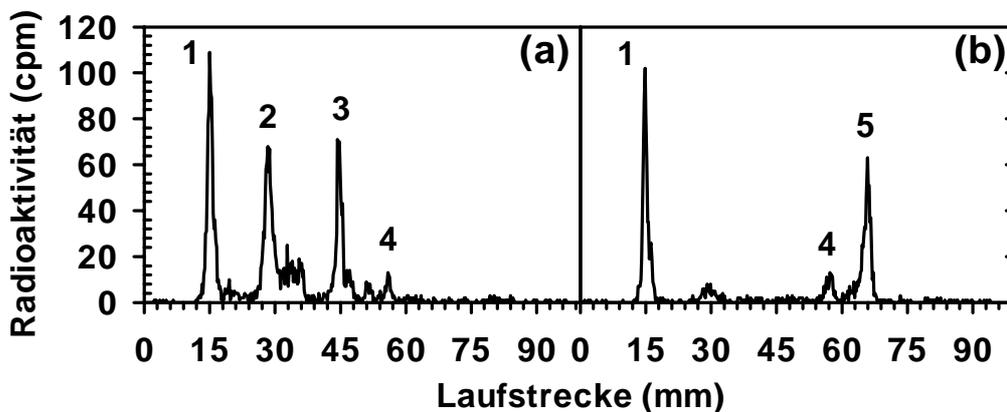


Abbildung 64: Isolierte Meerschweinchenhirn- und -leberganglioside als exogene Akzeptoren für die solubilisierete 4-OAT

(a) Hirnganglioside als exogene Akzeptoren.

(b) Leberganglioside als exogene Akzeptoren.

1 = AcCoA

4 = Azetat

2 = 4-O-Ac-GT1b

5 = 4-O-Ac-GM3

3 = 4-O-Ac-GD1b

Meerschweinchenserum enthielt nur kleine Gangliosidmengen, von denen zwei in größerer, eines in untergeordnetem Maße auftraten (Abbildung 65(b)). Wie in der Abbildung angegeben, handelt sich bei den drei Banden um GD3, GM2 und GM3. Eine vierte Bande ist in der Nähe des Auftragsortes zu erkennen. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um freie Neu5Ac, da diese Bande durch das Lipidfärbereagenz Primulin (\uparrow 2.2.1.3) nicht angefärbt werden konnte.

Meerschweinchenleber enthielt überraschenderweise nur ein Gangliosid, das als GM3 charakterisiert werden konnte (Abbildung 65(a)). Der gleiche Retentionsfaktor wurde durch Co-Migration mit authentischem GM3 festgestellt.

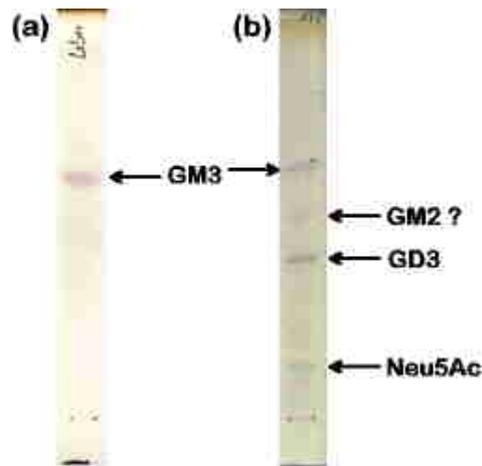


Abbildung 65: Gangliosidisolat aus Meerschweinchenserum und -leber

- (a) Meerschweinchenleber enthielt nur ein Gangliosid, das durch authentische Standards und Inkubationsexperimente als GM3 identifiziert werden konnte
- (b) Meerschweinchenserum enthielt drei Ganglioside, von denen eins nur in geringer Konzentration auftrat.

Nach Inkubation des Lebergangliosids in Enzymtest 5 wurde an der gleichen Stelle eine radioaktive Bande erhalten, wie nach der Inkubation von authentischem GM3 (Abbildung 66(b)). Daß dieses Gangliosid ferner Bestandteil der Golgi-Membran war, konnte durch Inkubation von endogenen Akzeptoren in Golgi-Membranensolubilisat mit einem hohen radioaktiven AcCoA-Anteil festgestellt werden (Abbildung 66(a)). Es wurden drei radioaktive Peaks erhalten, von denen der erste die gleiche Retentionszeit wie 4-*O*-Ac-GD3 und der dritte die gleiche Retentionszeit wie 4-*O*-Ac-GM3 aufwies. Zusätzlich konnte letzterer Peak durch Zugabe von radioaktivem 4-*O*-Ac-GM3 selektiv erhöht werden (Abbildung 66(b)). Der zweite neu entstandene Peak liegt dem 4-*O*-Ac-GM3-Peak sehr nahe, was darauf hindeuten mag, daß es sich um ein Isomer bezüglich des Ceramidteils handeln könnte.

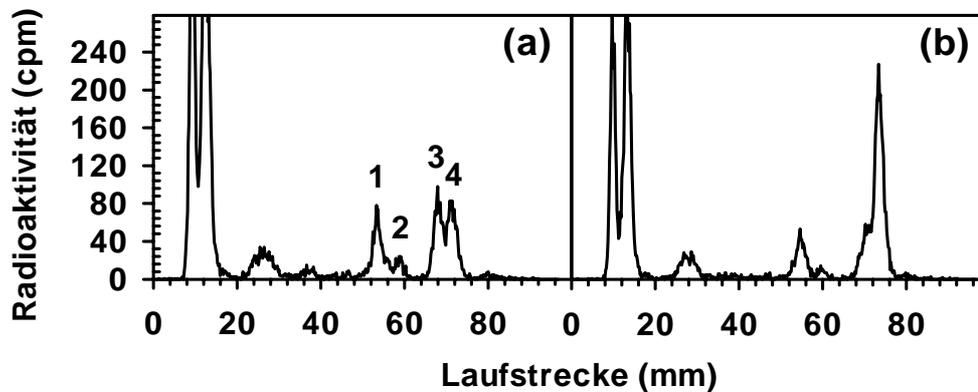


Abbildung 66: Endogene Akzeptoren im Solubilisat der Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen

Radioaktive Azetylierung endogener Akzeptoren im Solubilisat (a). Drei signifikante Peaks 1, 3 und 4 sind neben einem untergeordneten Peak 2 zu erkennen. Der große Doppelpeak zu Beginn des DC ist überschüssiges AcCoA. Durch Co-Chromatographie von 4-*O*-[³H]Ac-GM3 wurde Peak 4 spezifisch erhöht (b), so daß diese Substanz als 4-*O*-Ac-GM3 identifiziert wurde. Peak 1 entsprach dem Laufverhalten von 4-*O*-Ac-GD3 und Peak 2 war Azetat. Peak 3 ist nicht identifiziert worden, könnte aber ein isomeres 4-*O*-Ac-GM3 sein, das eine verkürzte Fettsäurekette im Ceramidteil aufweist.

3.8 Enzymreinigungsansätze

3.8.1 Chromatographien

Drei Ansätze der Enzymreinigung wurden durchgeführt. Eine "Affinitätschromatographie" mit der Triazinfarbstoffsäule Cibacron Blue-F3G-A-Agarose, eine Kationenaustauschchromatographie mit dem starken Kationenaustauscher S-Sepharose und eine Affinitätschromatographie mit CoA-Agarose (↑ 2.2.5.19).

3.8.1.1 Cibacron Blue F3G-A-Agarosechromatographie

Die Affinitätschromatographie mit der Farbstoffsäule erwies sich für die Enzymreinigung ohne großen Wert. Die Abtrennung nicht aktiven Proteins war unbefriedigend und der Fremdproteinanteil in der aktiven Fraktion sehr groß (Abbildung 67). Obwohl der Farbstoff selbst gute inhibitorische Eigenschaften zeigte (↑ 3.6.11.2), war dessen Anwendung in einer Chromatographie für die 4-OAT ohne Bedeutung.

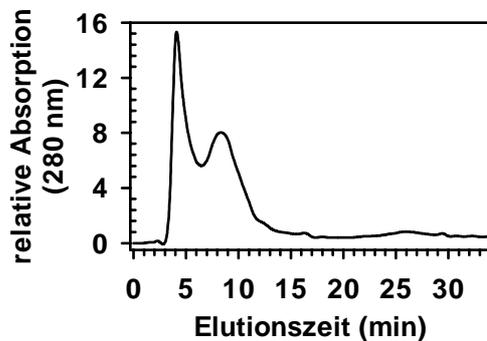


Abbildung 67:

Cibacron Blue F3G-A-Agarose-Chromatographie

Die Trennung der solubilisierten Golgi-Membranproteine war dürftig. Zumindest bestand eine Wechselwirkung zwischen Matrix und einem Teil des Proteins, da eine Antrennung von Proteinen erzielt werden konnte. Eine Anwendung dieser Chromatographie wurde zugunsten anderer leistungsfähigerer Methoden nicht weiter verfolgt.

3.8.1.2 Kationenaustausch an S-Sepharose

Sehr effektiv erwiesen sich die beiden anderen Chromatographien in ihrer Einzelanwendung. An den Kationenaustauscher S-Sepharose band nicht sämtliches Protein, so daß sich etwa ein Viertel des Gesamtproteins im Durchlauf wiederfand. Die Trennleistung dieser Säule wurde durch Salzelution im Batchverfahren deutlich verbessert. Nachdem die Enzymprobe in einem Puffer mit niedriger Salz- und Pufferkonzentration aufgetragen worden war, eluierte nochmals ein Großteil inaktiven Proteins bei Chromatographie mit optimalem Puffer. Erst die Elution mit 200 mM Kaliumchlorid enthaltendem Puffer führte zu einer zum Proteinpeak leicht versetzten Elution der 4-OAT-Aktivität. Die Proteinausbeute lag bei etwa 20 %-25 % des aufgetragenen Gesamtproteins. In einer reinigenden und abschließenden 500 mM Kaliumchloridelution wurde nur noch sehr wenig Protein eluiert, das zudem keine 4-OAT-Aktivität mehr besaß (Abbildung 68).

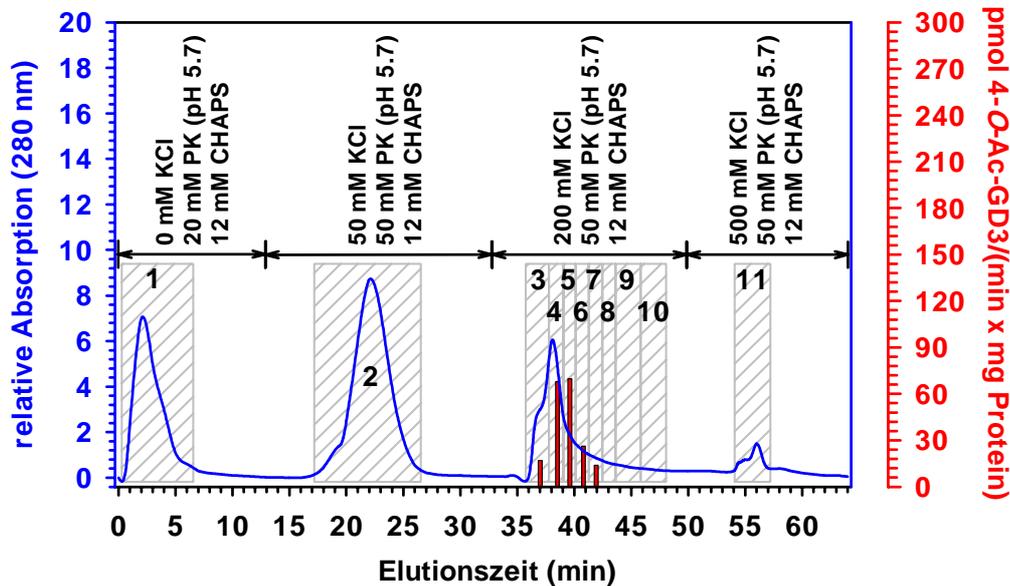


Abbildung 68: S-Sepharose-Kationenaustauschchromatographie mit 30 kDa-ultrafiltriertem Golgi-Membranensolubilisat

Die **blaue Kurve** repräsentiert das durch UV-Absorption ermittelte eluierte Protein, der **rote Graph** die ermittelte spezifische 4-OAT-Aktivität. Der Umfang der gesammelten Fraktionen ist durch grau schraffierte Kästen gekennzeichnet. Auftrag und Elution erfolgte in vier verschiedenen Puffern, deren Anwendung durch aufgespannte Pfeile induziert ist. Über den Pfeilen ist die Pufferzusammensetzung angegeben.

Der Großteil des aufgetragenen und nicht aktiven Proteins eluierte im Durchlauf der Säule und der Elution mit 50 mM Kaliumchlorid enthaltenden Kaliumphosphatpuffer (PK). Die 4-OAT-Aktivität konnte durch PK mit einem 200 mM Kaliumchloridanteil eluiert werden.

Die Proteinanalyse über SDS-PAGE (\uparrow 2.2.5.20) war schwierig, da mit niedrigsten Mengen an Proteinausbeute und deswegen auch an der unteren Detektionsgrenze des Proteinbestimmungstests gearbeitet wurde. SDS-PAGE-Analysen sollten mit gleichen Proteinkonzentration für jede analysierte Spur auf dem Gel erfolgen. Durch Ungenauigkeiten im Proteintest kam es dabei aber stets zu Abweichungen. Mehrfache Analysen einer Fraktion waren aus Mangel an Material nicht möglich. All diese Gesichtspunkte müssen bei späteren Reinigungsversuchen berücksichtigt werden. In Abbildung 69 sind die Gelspuren einer S-Sepharose-Chromatographie zu sehen, die mit einem achtprozentigen Gel unter reduzierenden Bedingungen erhalten wurden.

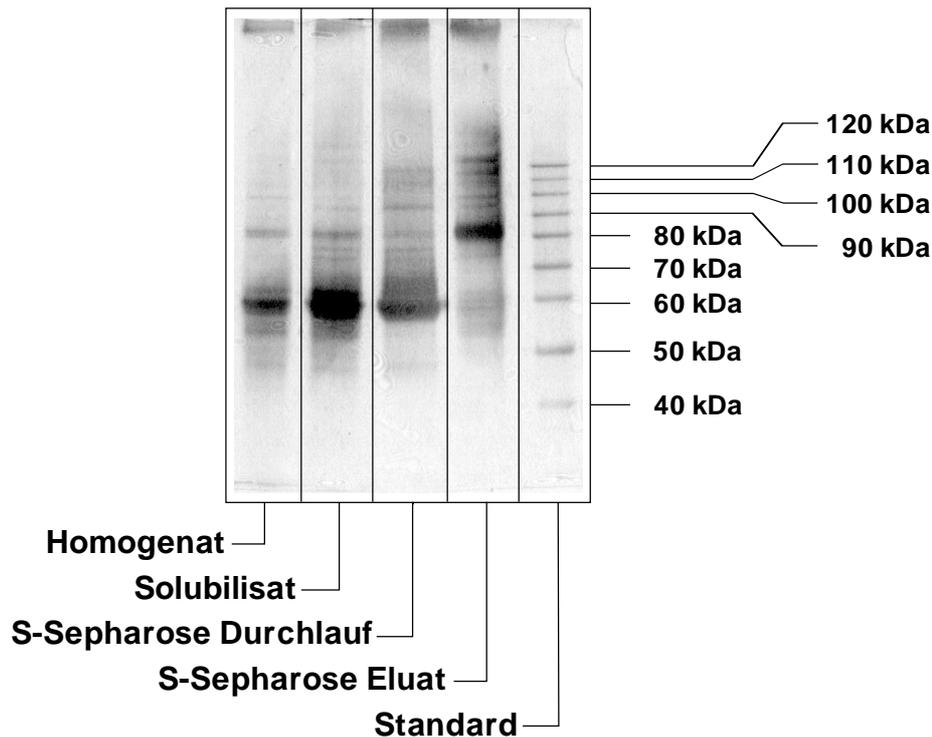


Abbildung 69: SDS-PAGE-Analyse nach Chromatographie von Meerschweinchenleber-Golgi-Membranensolubilisat auf S-Sepharose

Es handelt sich um eine achtprozentiges Gel, das unter reduzierenden Bedingungen entwickelt wurde. Die Anreicherung war zweifach, die Ausbeute betrug lediglich 4 %.

Das meiste Protein im Solubilisat findet sich im Durchlauf wieder. Das die aktive 4-OAT enthaltende Eluat enthält kaum Proteine um die 60 kDa, aber viele Proteine die größer als 70 kDa sind.

Es ist deutlich die Abtrennung von Protein bei der Elution des Proteins zu erkennen. Proteine, die im Solubilisat vorhanden sind, binden nicht an die Matrix und waren im Durchlauf wiederzufinden. Obwohl der 60 kDa-Bereich im Eluat fast verschwunden war, sind gerade im Bereich über 70 kDa viele verschiedene Protein zu erkennen. Da Proteine kleiner als 60 kDa in diesem Gel schlecht zu erkennen sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch hier noch Proteine zu erwarten sind. Durch die Kationenaustauschchromatographie konnte eine Anreicherung um das etwa Zweifache erreicht werden. Die Ausbeute war mit 4 % äußerst gering. Unbedingt muß in Zukunft einer Zerstörung des Proteins während der Chromatographie begegnet werden.

3.8.1.3 Affinitätschromatographie an Co-Agarose

Das Ergebnis der CoA-Agarose-Affinitätschromatographie sah noch eindeutiger aus. Das Protein konnte in optimalem Puffer aufgetragen werden, ohne daß aktives Protein im Durchlauf zu finden war. Eine Batch-Elution mit 200 mM Kaliumchlorid enthaltendem Puffer führte anschließend fast zur Elution des an die Matrix gebundenen aktiven Proteins. Die Elution der 4-OAT erfolgte auch hier zeitlich versetzt zum detektierten Proteinpeak. Die Ausbeute betrug etwa 15-20 % des aufgetragenen Gesamtproteins. Nur noch ein zu vernachlässigender und ausserdem in-

aktiver Proteinanteil wurde bei der abschließenden 500 mM Kaliumchloridelution erhalten (Abbildung 70).

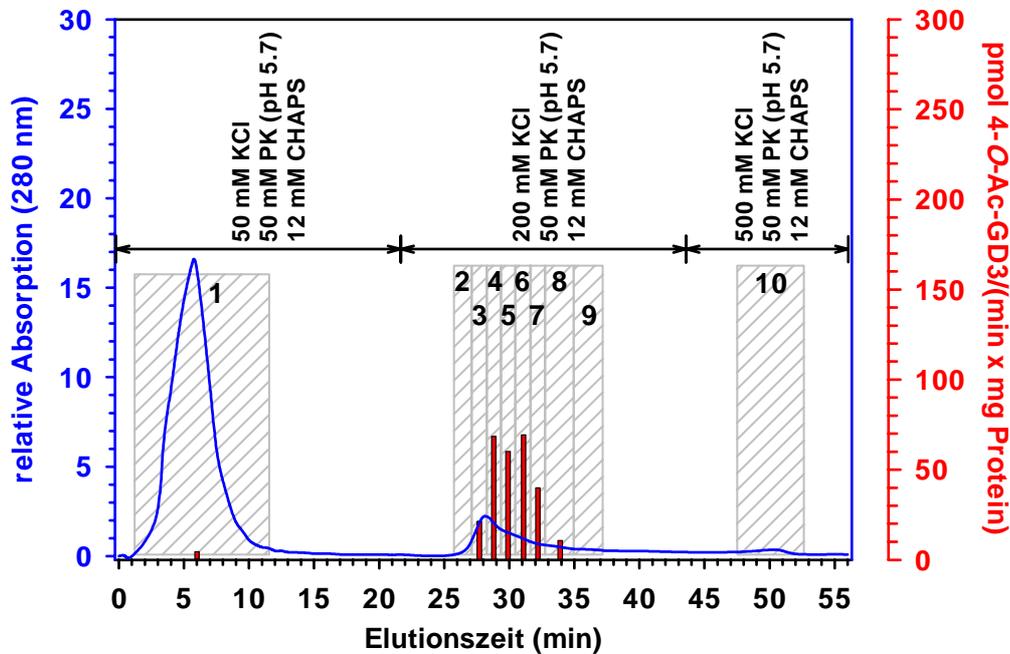


Abbildung 70 CoA-Agarose-Affinitätschromatographie mit 30 kDa-ultrafiltriertem Golgi-Membranen-solubilisat

Die **blaue Kurve** repräsentiert das durch UV-Absorption ermittelte eluierte Protein, der **rote Graph** die ermittelte spezifische 4-OAT-Aktivität. Der Umfang der gesammelten Fraktionen ist durch grau schraffierte Kästen gekennzeichnet. Auftrag und Elution erfolgte in drei verschiedenen Puffern, deren Anwendung durch aufgespannte Pfeile induziert ist. Über den Pfeilen ist die Pufferzusammensetzung angegeben.

Der Großteil des aufgetragenen und nicht aktiven Proteins eluierte im Durchlauf der Säule. Die 4-OAT-Aktivität konnte durch Kaliumphosphatpuffer (PK) mit einem 200 mM Kaliumchloridanteil eluiert werden.

Eine Proteinanalyse der relevanten Fraktionen der Affinitätschromatographie mit SDS-PAGE bewies in der Tat eine Anreicherung vieler Proteine aus dem Solubilisat um die 60 kDa und im Bereich unter 30 kDa. Allerdings ist die Zahl der Proteine nach der Chromatographie immer noch zu groß, um von einer gezielten Reinigung zu sprechen. Dennoch, in einem einzigen Schritt konnten sehr viele Proteine abgetrennt werden (Abbildung 70). Die Anreicherung gelang durch diese Chromatographie um das Dreifache, die Ausbeute lag bei niedrigen 3 %.

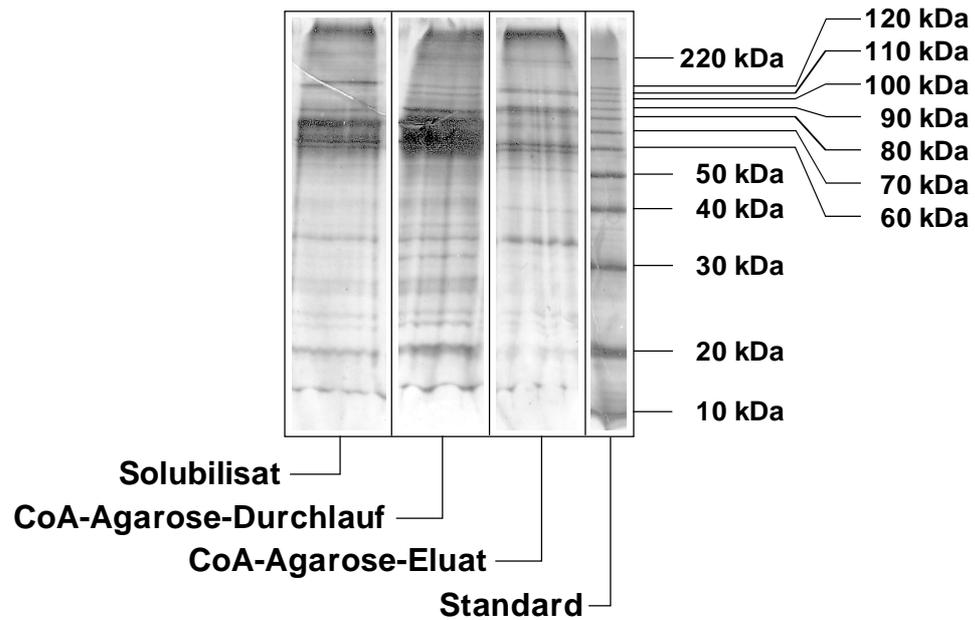


Abbildung 71 SDS-PAGE-Analyse nach Chromatographie von Meerschweinchenleber-Golgi-Membranensolubilisat auf CoA-Agarose

Es handelt sich um eine zwölfprozentiges Gel, das unter reduzierenden Bedingungen entwickelt wurde. Die Anreicherung war dreifach, die Ausbeute betrug lediglich 3 %.

Das meiste Protein im Solubilisat findet sich erneut im Durchlauf wieder. Das die aktive 4-OAT enthaltende Eluat enthält wenige Proteine um die 60 kDa und sehr wenig Protein, das kleiner als 30 kDa ist, aber einige Bestandteile die größer als 70 kDa sind.

So gut und effektiv beide Chromatographien angewandt auf das Solubilisat funktionierten, eine wesentliche Steigerung der Aufreinigung durch Kombination beider Chromatographieschritte wurde nicht mehr erzielt (Abbildung 71).

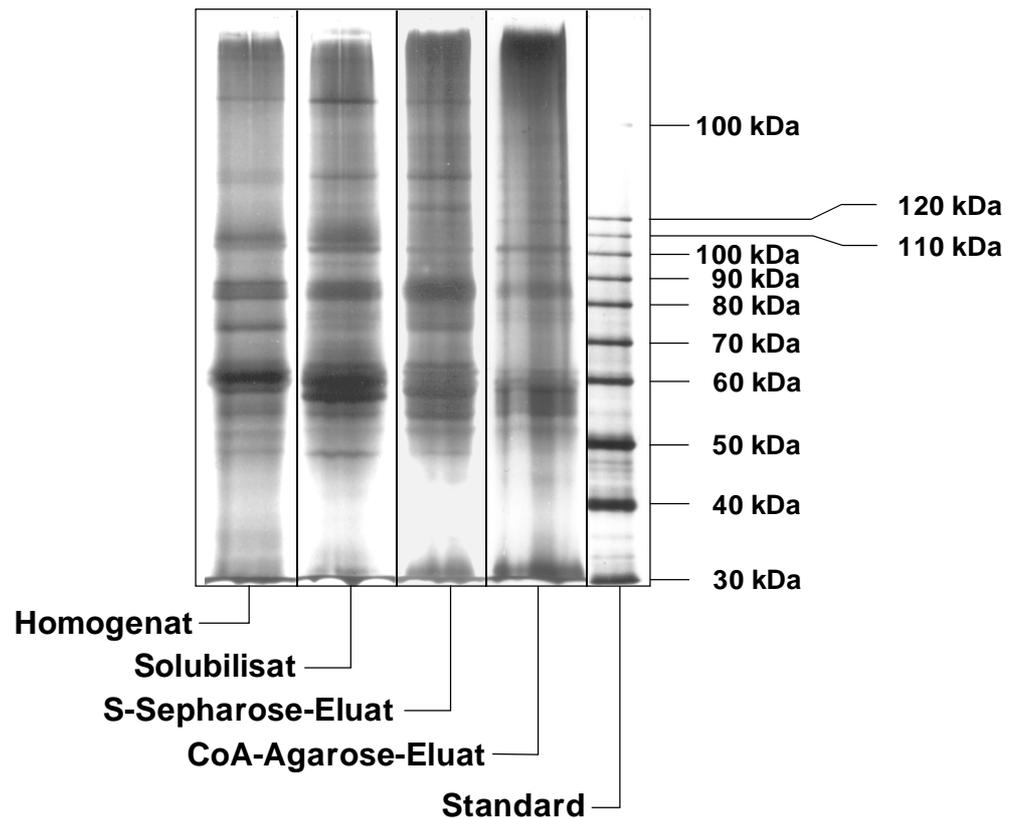


Abbildung 72: SDS-PAGE-Analyse nach Chromatographie von Meerschweinchenleber-Golgi-Membranensolubilisat auf S-Sepharose und anschließend CoA-Agarose

Es handelt sich um ein achtprozentiges Gel, das unter reduzierenden Bedingungen entwickelt wurde.

Auch eine Affinitätschromatographie nach dem Kationenaustausch führte zu keiner wesentlichen Verbesserung bei der Reinigung der 4-OAT.

Dies mag einerseits an einer schon ziemlich selektiven Proteinbindung durch den Kationenaustausch liegen, der zu keiner weiteren Trennung im Affinitätsschritt führt und andererseits an der ebenfalls kationenbindenden Fähigkeit des CoA-Moleküls. Darüberhinaus ist die CoA-Matrix vielleicht nicht spezifisch genug, da andere adenosinnukleotidabhängige Enzyme an die Säule zu binden vermögen.

Für zukünftige Experimente muß in erster Linie an einer Stabilisierung der Enzymaktivität durch Antioxidantien und andere Zusätze gedacht werden, bevor die eigentliche Reinigung zustande kommen kann.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung von 4-OAT-Testsystemen

Die Entwicklung eines geeigneten Enzymtestsystems war Grundvoraussetzung für die angestrebte Reinigung der 4-OAT über verschiedene Chromatographien. Die Anforderungen an ein solches Testsystem sind klar umrissen, da bei einer solchen Enzymreinigung einerseits die Enzymkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen sehr viel geringer sind als in der aufgetragenen Probe, andererseits mit Verlusten während der Chromatographie gerechnet werden muß. Der Enzymtest muß spezifisch, hoch sensitiv und letztendlich auch schnell durchführbar sein. Diese Ansprüche wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit Schritt für Schritt verbessert und richteten sich konkret nach den erfolgreich getesteten exogenen Akzeptoren. Insgesamt wurden fünf Testsysteme entwickelt, die von dem Test des membrangebundenen Enzyms mit endogenen Akzeptoren über freie Sia bis hin zu Gangliosiden führten. Ein Test mit endogenen Akzeptoren war von vornherein zu vernachlässigen, da diese erst hätten gereinigt werden müssen und endogen in viel zu geringer Konzentration vorlagen. Deswegen kam dieses Testsystem lediglich für orientierende Versuche für die Wahl des geeigneten Detergenzes in Betracht. In Hinblick auf freie Sia oder Sialooligosaccharide als exogene Akzeptoren wurde Testsystem 2 entwickelt, das im Wesentlichen auf dem Protokoll für die Reinigung von Sia basierte. Der bei der Sia-Reinigung normalerweise verwandte Kationenaustauschschritt wurde aus Zeit- und Substanzverlustgründen ausgespart. Das Ergebnis war überzeugend, war doch als einzige Substanz nur die 4-O-azetylierte Sia oder das entsprechende Sialosaccharid zu detektieren. AcCoA, welches in dem Inkubationsansatz stets im Überschuß vorhanden war, konnte durch den Anionenaustauschschritt abgetrennt werden, da es unter den Elutionsbedingungen für Sia und Sialosaccharide nicht eluiert, sondern erst bei höheren Säurekonzentrationen erhalten wurde. Kam es dennoch zu einer teilweisen Co-Elution mit AcCoA, konnte AcCoA durch wesentlich niedrigere Retentionsfaktoren eindeutig identifiziert werden. Eine weitere Verbesserung des Testsystems wurde durch Enzymtest 3 erreicht, in dem vor den Anionenaustauschschritt eine Ultrafiltration geschaltet wurde, um endogene Golgi-Proteine abzutrennen. Dadurch war es ferner möglich, die endogenen 4-O-azetylierten Akzeptoren von den exogenen zu trennen. Variante 2 dieses Testsystems erlaubte es, durch Aussparen der Solubilisierung zu beweisen, daß exogene Akzeptoren auch durch die membrangebundene 4-OAT 4-O-azetyliert werden konnten. All diesen positiven Attributen zum Trotz lag ein Analyseergebnis erst zwei bis drei Tage nach der Inkubation vor und machte diesen Enzymtest für eine Enzymreinigungsstrategie unattraktiv, zumal auch die Empfindlichkeit des

Tests nicht überzeugend war. Auf der Suche nach geeigneteren exogenen Akzeptoren war das Austesten verschiedener sialylierter Proteine enttäuschend. Selbst humanes α_2 -Makroglobulin, das sich in seinen *N*-Glykanstrukturen wenig von denen des Meerschweinchens unterschied (HANAOKA *et al.*, 1989) konnte den Erwartungen bei weitem nicht genügen. Erst der Einsatz von Gangliosiden brachte eine Wende. Das hierfür ausgearbeitete Enzymtestsystem 4 stützte sich auf die Extraktion und Analyse von Gangliosiden nach Folch *et al.*. Allerdings ist eine Extraktion der Ganglioside aus dem Inkubat bei Verwendung von radioaktiven Proben höchst problematisch und eignete sich nicht für den Durchsatz großer Probenzahlen. Daher wurde die Vorgehensweise dahingehend modifiziert, daß keine Extraktion, sondern zum Abstoppen der Enzymreaktion ein Ein-Phasen-System erzeugt wurde, in dem die Proteine präzipitierten und die Ganglioside in Lösung blieben. Nach Zentrifugation konnte der anschließend aufkonzentrierte Überstand direkt analysiert werden. Enzymtest 5 war schließlich die optimierte Variante des zuvor beschriebenen Vorgängertests und beruhte auf der Minimierung des Inkubationsansatzes von 100 auf 25 μ l, so daß auf eine Chloroform-Methanol-Behandlung verzichtet werden konnte. Die Enzymreaktion wurde stattdessen durch Schockfrieren gestoppt und nach Auftauen auf Eis direkte per DC analysiert. Bei allen Enzymtests war das zwitterionische Detergenz CHAPS problematisch, da es in keinem der Reinigungsschritte entfernt werden konnte. Glücklicherweise war das chromatographische Laufverhalten des Detergenzes im Vergleich zu den gewünschten Produkten abweichend, und beeinträchtigte die Analyse somit nicht. Mit Enzymtest 5 ist ein Analyseergebnis nun schon nach 3 h erhältlich.

Als Fazit konnte eine schnelles und hochempfindliches Enzymtestsystem konstruiert werden, das allgemeingültige Anwendung fand. Die eingesetzte Radioaktivitätsmenge von 4.6 kBq [3 H]AcCoA pro Inkubationsansatz ist tolerierbar. Auch der Einsatz von etwa 5 μ g Gangliosid pro Inkubationsansatz ist trotz der hohen Kosten von Gangliosiden vertretbar. Eine Gangliosidpräparation aus Rinderhirn stellt eine preisgünstigere Alternative dar.

4.2 Charakterisierung der Enzymprodukte

Eine Aufgabe während der Untersuchungen mußte die Analyse und eindeutige Charakterisierung der enzymatischen Azetylierungsprodukte sein, sollte doch zweifellos die 4-OAT aus Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen isoliert werden. So war die Vorgabe für jeden Enzymtest, in dem neue exogene Akzeptoren eingesetzt wurden, die Produkte auf 4-O-azetylierte Sia zu untersuchen. Wie schon für das membrangebundene System praktiziert, wurde für Enzymtest 1 aus endogenen Akzeptoren durch Säurehydrolyse Neu4,5Ac₂ freigesetzt und auf DC durch Co-Chromatographie mit authentischem Standard nachgewiesen. Für Neu5Ac als

exogenem Akzeptor war die Analyse noch einfacher, da auf den säurehydrolytischen Schritt verzichtet werden konnte. Für Sialooligosaccharide wurden einerseits Sia nach Sia-Analyse und zum Teil die *O*-azetylierten Oligosaccharide direkt analysiert. Für exogene Proteine wurde wie mit endogenen Substraten verfahren. Alle azetylierten Substrate waren in gesättigter Ammoniakatmosphäre durch mehrstündige Behandlung vollständig verseifbar, was für *O*-azetylierte Spezies sprach und *N*-azetylierte Verbindungen ausschloß. Die Analyse von Gangliosiden erwies sich letztlich als eine Herausforderung. Für Ganglioside, die als sehr gute Akzeptoren fungierten, wurde nach milder Säurehydrolyse in keinem Fall die erwartete Neu4,5Ac₂-Ausbeute erzielt. Nach einem Verlust von etwa 30 % während der Hydrolyse hätten noch 70 % der ursprünglichen Konzentration zu finden sein müssen. Gefunden wurden jedoch nur maximal 10 %. Eine deswegen in Betracht gezogene, noch mildere enzymatische Hydrolyse durch die Sialidase aus dem Newcastle Disease Virus führte schließlich zum identischen Ergebnis. Da eine *O*-Azylesteraseaktivität ausgeschlossen werden konnte, blieb das Ergebnis unerklärlich. Einzige Möglichkeit war der Verlust der *O*-Azetylierung während der chemischen bzw. enzymatischen Hydrolyse. Eine negative Kontrolle erbrachte die Inkubation des *O*-azetylierten GD3 mit den bakteriellen Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Arthrobacter ureafaciens*. Die beiden Enzyme spalten auch α 2,3- und α 2,8-gebundene Sia, sind jedoch unfähig, 4-*O*-azetylierte Vertreter zu hydrolysieren. Das Ergebnis des Experiments bestätigte die Vermutung, GD3 enzymatisch 4-*O*-azetyliert zu haben, denn das *O*-azetylierte GD3 wurde während der Inkubation überhaupt nicht verändert. Im Ansatz zur Kontrolle enthaltenes, nicht-*O*-azetyliertes GD3 wurde dagegen vollständig zu Neu5Ac und Laktosylceramid abgebaut. Auch wenn die Hydrolysen von den 4-*O*-azetylierten Gangliosiden weit hinter den Erwartungen zurückblieben, so konnte das Produkt in seiner niedrigen Konzentration stets durch Co-Chromatographien mit authentischem Standard als Neu4,5Ac₂ identifiziert werden. Daß die im Gangliosid gebundenen Sia die Akzeptorfunktion übernahmen, war aus einer Vergleichsinkubation mit dem "Asialo-GD3" Laktosylceramid ersichtlich, welches nicht als Akzeptor fungierte. Eine nichtenzymatische Reaktion konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Darüberhinaus diente 9-*O*-azetyliertes GD3 wie auch schon Neu5,9Ac₂ in demselben Maße als Akzeptor wie die nicht *O*-azetylierte Komponenten, ein Beweis dafür, daß die enzymatische Azetylierung nicht an Position 9 erfolgte. Auch eine Co-Migrationsanalyse von 9-*O*-azetyliertem GD3 mit enzymatisch *O*-azetyliertem GD3 zeigte ein eindeutig differentes Laufverhalten. Eine präzise Beweisführung gelang schließlich mit Neu4Ac5Gc-GM3. Einerseits ließ sich dieses Gangliosid nicht enzymatisch *O*-azetylieren, andererseits gelang die *O*-Azetylierung des de-*O*-azetylierten Substrats, wobei die Identität des Produkts durch Co-Migration mit dem au-

thentischen Standard bewiesen werden konnte. Was auch schon im Fall freier Neu4,5Ac₂ beobachtet worden war, konnte also auf Ganglioside übertragen werden.

Aus vielen Experimenten läßt sich somit ein Mosaik zusammensetzen, das in seinem Gesamteindruck ein klares Bild wirft: Bei dem aus Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen solubilierten Enzym handelt es sich ohne jeden Zweifel um eine 4-OAT, die in allen angebotenen und umgesetzten Substraten die 4-OH-Gruppe der Sia azetyliert.

4.3 Charakterisierung der 4-OAT-Reaktion

Die Charakterisierung der 4-OAT-Reaktion umfaßte drei Bereiche:

1. Die Ermittlung der optimalen Inkubationsparameter (Detergenz-, Puffer- und Salzkonzentration, pH, Temperatur und Zeit),
2. Kinetische Parameter,
3. Einfluß bestimmter Zusätze.

Bezüglich der optimalen Detergenzkonzentration konnten unterschiedliche Einflüsse ausgemacht werden. War für endogene Substrate und exogenes Neu5Ac ein Optimum bei etwa 20 mM bzw. 14 mM zu beobachten, über das hinaus die Enzymaktivität wieder abfiel, so war für GD3 als exogenem Akzeptor eine Plateaubildung bei CHAPS-Konzentrationen höher als 14 mM zu registrieren. Zwei Besonderheiten sind dementsprechend bemerkenswert. Erstens lag für endogene Substrate die optimale CHAPS-Konzentration bedeutend höher als für exogene, wasserlösliche Substrate, und zweitens unterschied sich GD3 von den anderen untersuchten Substraten durch das Fehlen eines CHAPS-Optimums. Lediglich eine Mindestkonzentration war einzuhalten. Wird nach Gründen für dieses Verhalten gesucht, so fällt konkret der molekulare Unterschied auf, denn Ganglioside bilden in wäßrigen Lösungen Mizellen und in Anwesenheit von CHAPS Mischmizellen mit dem Detergenz. So wird sich die Präsentation dieses Akzeptors im Solubilisat mit Sicherheit von der der anderen Akzeptoren grundlegend unterscheiden. Ob dies der Grund für das veränderte Verhalten ist, konnte hier aber nicht abschließend geklärt werden.

Die optimale Kaliumphosphatpufferkonzentration und Kaliumchloridkonzentration (je 50 mM) fielen im Vergleich zum membrangebundenen System beide etwas niedriger aus, wobei für Kaliumchlorid eine reversible Inhibition bis zu einer Konzentration von 200 mM ermittelt werden konnte. Die optimale Temperatur war bei 30 °C für solubilierte und membrangebundene 4-OAT identisch. Die 4-OAT-Reaktion erwies sich als schnell für das jeweilige Substrat. Für das membrangebundene System war der lineare Bereich der Reaktion schon nach 5 min verlassen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die Zeitcharakteristik der 4-OAT-Reaktion für exogenes Neu5Ac davon deutlich unterschied, denn schon nach den ersten Minuten

der Inkubation war der lineare Bereich verlassen und mündete über 60 min lang in den Plateaubereich ein. Für GD3 waren linearer und Plateaubereich wiederum klar abgegrenzt. Nach 15-20 min linear ansteigender Produktausbeute war das Plateau nach weiteren 20 min erreicht. Eine Überraschung barg die Bestimmung des optimalen pH-Werts der Enzymreaktion, da der Wert für die solubilisierete 4-OAT von pH 6.7 für das membrangebundene System auf pH 5.7 um pH 1 in den sauren Bereich verschoben war. Für den Golgi-Komplex wurden neueren Untersuchungen zufolge natürliche pH-Werte im milden sauren Bereich nahe der Neutralität festgestellt (SEKSEK *et al.*, 1995; LLOPIS *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2000). Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Enzymtests wurde das verbrauchte Substrat AcCoA nicht wieder regeneriert. Dadurch kam es im Reaktionsansatz während der Inkubation zu einem Konzentrationsanstieg des Inhibitors CoA. Durch Nachinkubation mit frischem AcCoA konnte aber kein erneuter Anstieg der 4-O-azetylierten Produkte festgestellt werden. Dies ist ein Beweis dafür, daß AcCoA unter den Inkubationsbedingungen in ausreichendem und notwendigem Überschuß vorhanden war. Nachdem die grundsätzlichen Optimums-Parameter bestimmt worden waren, konnten kinetische Betrachtungen realisiert werden. Die Reaktionen von AcCoA und der Ganglioside konnten wie auch schon bei dem membrangebundenen System nach den Gesichtspunkten einer Michaelis-Menten-Kinetik behandelt werden. Alle Substrate hatten einen K_M -Wert, der im niederen mikromolaren Bereich angesiedelt war und den Substraten eine hohe Affinität zur 4-OAT bescheinigte. Da für AcCoA und GM3 die maximale Geschwindigkeit der Reaktion im Vergleich zu den getesteten Disialogangliosiden bis zu zehnmal kleiner ausfiel, waren die entsprechenden Werte der katalytischen Effizienz am niedrigsten, wobei der von GM3 aufgrund seines relativ hohen K_M -Wertes besonders niedrig lag. Ob die etwa doppelt so hohe katalytische Effizienz von GD1a im Vergleich zu GD1b für eine 4-O-Azetylierung der zweiten Sia im Molekül spricht, kann nicht als Beweis gelten, können hier doch auch andere strukturelle Aspekte mit eingehen. Allerdings ist auf dünnschichtchromatographischen Abbildungen ein markant anderes Laufverhalten zu bemerken, das sich durch einen unerwartet hohen Retentionsfaktor auszeichnet, der durch eine mehrfache O-Azetylierung gut zu erklären wäre. Auch die Inhibition durch das in der 4-OAT-Reaktion ständig anfallende CoA war mit einem apparenten K_i -Wert von 14.8 μM sehr effektiv und darüberhinaus rein kompetitiv, was aus der graphischen Auswertung der Meßergebnisse eindeutig hervorging. In dieser Hinsicht hatte sich die Inhibitionskinetik gegenüber dem gemischt kompetitiv inhibierbaren membrangebundenen System geändert. Da das Enzym nach Solubilisierung nicht mehr in geordneten Verhältnissen in der Golgi-Membran eingebettet war und die Akzeptoren freien Zugang zum Enzym besaßen, war die veränderte Kinetik nicht überraschend. Neben CoA als kompetitivem Inhibitor wurden auch

strukturell ähnliche Verbindungen auf ihre inhibitorische Wirkung getestet, um abzuschätzen, welcher Teil des Moleküls für die Erkennung durch das Enzym von Bedeutung war. Aufgrund des hohen Aufwandes für inhibitorische Kinetiken wurde für die weiteren Inhibitionsbetrachtungen auf quantitative Untersuchungen verzichtet. Desulfo-CoA erwies sich dabei ebenfalls als potenter Inhibitor, der bei einer Konzentration von 13 μM die 4-*O*-Ac-GD3-Synthese um 50 % inhibierte und damit so effektiv war wie CoA selbst. Dies sprach dafür, daß die 4-OAT eher den Nukleotidteil des Moleküls erkannte. Ein notwendiges Experiment war deswegen auch die Inhibition durch das in CoA enthaltene Nukleotid 3',5'-ADP. Tatsächlich inhibierte diese Verbindung in einer 1 mM Konzentration zu mehr als 80 %, was für dieses im Vergleich zu CoA sehr reduzierte Molekül beachtlich war und die nukleotiderkennende Eigenschaft der 4-OAT unterstrich. Da 3',5'-ADP inhibierte, wurde der Blick auf ähnliche Nukleotide des Purin-Typs zur Pflicht. Vor allen Dingen stachen hierbei AMP, ATP, NADH, NADPH und die Inosin-Nukleotide IMP, IDP und ITP hervor, da die genannten Adenosin-Nukleotide kaum, die Inosin-Nukleotide dafür aber um so deutlicher inhibierten, wenn auch nicht so stark wie 3',5'-ADP. Dabei konnte die Stärke der Inhibition in allen Fällen mit steigendem Phosphorylierungsgrad korreliert werden. ITP hemmte die Enzymreaktion in 1 mM Konzentration zu immerhin mehr als 55 %. Ein vollkommen unerwartetes Bild offenbarte sich für das CoA-Derivat 3'-Dephospho-CoA. Da sich das Molekül lediglich durch eine fehlende Phosphatgruppe an der 3-OH-Position der Ribose von CoA unterschied, wurde von einer ähnlichen Inhibition ausgegangen wie es Desulfo-CoA auch schon zeigte. Doch die Inhibition der 4-OAT-Reaktion gelang auch bei Erhöhung der Inhibitorkonzentration nur zu maximal 50 %, die schon ab 5 μM 3'-Dephospho-CoA erreicht wurden. Es sah so aus, als würde der Inhibitor gleichzeitig als Substrat für eine Azetylierungsreaktion fungieren und da die Verbindung die gleiche alkalische Verseifungscharakteristik wie AcCoA aufwies und dabei nicht ganz so empfindlich wie eine De-*O*-azetylierung reagierte, war von einer *S*-Azetylierung auszugehen. Durch weitere Experimente wurde außerdem die enzymatische Natur dieser Reaktion bewiesen. Eine weitere Auffälligkeit der Inhibitionsreaktion war der ausschließlich während der Inhibition stattfindende Anstieg der AcCoA-Konzentration. Demgegenüber erfolgte die 3'-Dephospho-AcCoA-Synthese über den gesamten Bereich stetig und mündete schließlich in ein Plateau. Dies ließ vermuten, daß eine CoA-Azetylierung auf Kosten der 4-*O*-Azetylierung ablief.

Das 3'-Dephospho-CoA-Azetylierungsprodukt hatte schon früher für Interesse gesorgt, als über die Natur dieser Verbindung noch nichts bekannt war. Es wurde nämlich bei Wechsel des Inkubationspuffers von Phosphatpuffer zu Sulfonsäurepuffern die Beobachtung eines zweiten Reaktionsprodukts gemacht, das aber offensichtlich nichts mit einer Sialat-*O*-Azetylierung zu

tun hatte. Die Annahme, es könnte sich um ein Abbauprodukt des AcCoA handeln, führte zur Identifizierung von 3'-Dephospho-AcCoA als dem gesuchtem Molekül, da Phosphationen offenbar als Inhibitor dieser enzymatischen Reaktion fungierten. Die Inhibitorstudien mit 3'-Dephospho-CoA ergänzten das Bild ideal. In den folgenden 4-OAT-Reinigungsansätzen konnte die entsprechende Phosphataseaktivität stets von der 4-OAT-Aktivität abgetrennt werden. Es handelte sich dabei also um ein eigenständiges Enzym.

Andere Inhibitoren gelangten ebenfalls zum Einsatz, die wahrscheinlich aufgrund unspezifischer Effekte wirkten. Dazu gehören

1. das Disulfidbrückenbindungen zerstörende *p*-CMB, das seine Effektivität der hohen Affinität von Quecksilber zu Schwefel verdankt,
2. das sulfonierte Stilbenderivat DIDS, welches neben den stark anionischen Sulfonsäuregruppen auch reaktive Isothiocyanatgruppierungen trägt, die mit Aminogruppen Bindungen eingehen können (vgl. dazu auch (EDMAN und BEGG, 1967; HUCHO und TSETLIN, 1998)),
3. das als Co-Faktor für z.B. Transaminasereaktionen fungierende PLP, welches einerseits anionischen Charakter besitzt, andererseits eine hochreaktionsfähige Aldehydgruppe trägt und
4. der Triazinfarbstoff Cibacron Blue F3G-A, der, gebunden an Agarose, gerne als Purinnukleotidbindende Affinitätsmatrix genutzt wird, dessen Wirkungsweise in diesem Zusammenhang allerdings unklar bleibt, da das Molekül keine Ähnlichkeit mit Purinnukleotiden aufweist und eine Vielzahl funktioneller Gruppen im Molekül vereint (LOWE und PEARSON, 1984; STELLWAGEN, 1990).

Die genannten Verbindungen hemmten die 4-OAT-Reaktion bei relativ hohen Konzentrationen. Andere Zusätze, die gewöhnlich für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität während der Enzymreinigung eingesetzt werden, wurden ebenfalls ausgetestet. Auffallend war hierbei auf der einen Seite die schwache Erhöhung der Enzymaktivität durch Zusatz von Glycerin, insbesondere aber von Saccharose und auf der anderen Seite die Verminderung der Enzymaktivität durch Zugabe von DTT. 2-Mercaptoethanol und 2-Mercaptoethanolamin hatten keinen Einfluß, wobei letzteres auch Bestandteil des AcCoA-Moleküls war. EDTA wurde außer der Reihe mitgetestet, um zu erfahren, ob zwei- oder dreiwertige Metallkationen für die Enzymaktivität von Bedeutung waren. Wie ebensowenig die Zugabe zwei- oder dreiwertiger Metallkationen zu 30 kDa-ultrafiltriertem Enzym einen Effekt zeigte, widerlegte die Anwesenheit von EDTA im Inkubationsansatz die Notwendigkeit solcher Ionen für die Enzymaktivität.

Ein absolutes Novum bei der Untersuchung von *O*-Azetyltransferasen ist die Entdeckung eines für die Enzymaktivität erforderlichen Co-Faktors, der durch 30 kDa-Ultrafiltration vom Enzym abgetrennt werden konnte und sich als hitzestabil erwies. Ferner war die Substanz hydrophiler Natur, wie durch Reversed Phase-Chromatographie bewiesen werden konnte. Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration der Komponente mit Sättigungsgrenze sprach einmal mehr für die Co-Faktor-Eigenschaft dieser Komponente. Die molekulare Größe des Faktors konnte aufgrund eines 10 kDa-Ultrafiltrationsexperimentes mit kleiner als 10 kDa angegeben werden. Keine der als potentielle Co-Faktoren getesteten Substanzen hatten eine stimulierende Wirkung auf das ultrafiltrierte, Co-Faktor-freie Enzym. Kenntnisse über die molekulare Zugehörigkeit des Faktors konnten im Rahmen der Arbeit nicht erlangt werden. Eine über 30 kDa-Ultrafiltration aus Golgi-Membranensolubilisat hergestellte Co-Faktorlösung mußte jeder Fraktion eines chromatographischen Reinigungsschritts vor dem Enzymtest zugesetzt werden.

4.4 Reinigungsansätze für die 4-OAT

Drei Ansätze der 4-OAT-Reinigung wurden aufgrund der erzielten Ergebnisse verfolgt. Einerseits wurde wegen des optimalen Enzymtest-pH-Wertes und der Inkubation in Phosphatpuffer einer Kationenaustausch- gegenüber einer Anionenaustauschchromatographie der Vorzug gegeben. Andererseits sollte die Substratabhängigkeit des Enzyms für die Durchführung einer Affinitätschromatographie ausgenutzt werden. Dabei boten sich zwei Alternativen an: Erstens die Affinitätschromatographie an Triazinfarbstoffen mit einem breiten Wirkungsspektrum, aber hoher Säulenkapazität und zweitens eine spezifische, aber relativ teure Affinitätschromatographie an einer CoA-Matrix. Die Variante der Reinigung an der Triazinfarbstoffssäule Cibacron Blue F3G-A-Agarose wurde schon nach den ersten Versuchen verworfen, da keine ausreichende Trennung der Proteine und der 4-OAT erzielt werden konnte. Dagegen verhielt sich die CoA-Affinitätschromatographie vielversprechend, konnten doch in einem Schritt mehr als 80 % inaktiven Proteins abgetrennt werden. Erleichternd wirkte sich auch die Möglichkeit der Salzelution mit 200 mM Kaliumchlorid aus, die in diesem Konzentrationbereich die Enzymaktivität vollständig reversibel hemmt. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch mit der Kationenaustauschchromatographie erzielen. Hier wurde ein Großteil inaktiven Proteins durch ansteigende Salzkonzentrationen eluiert, bis bei 200 mM Kaliumchlorid auch die 4-OAT-Aktivität restlos von der Säule eluierte. Zwischen 70 % und 80 % inaktiven Proteins wurden somit abgetrennt. Natürlich war das Enzym damit noch nicht gereinigt, was sich auch in SDS-PAGE-Analysen zeigte, doch der erste und

wichtigste Schritt einer 4-OAT-Enzymreinigung war damit getan. Leider verbesserten die beiden nacheinander ausgeführten Chromatographien das Ergebnis der einzelnen Schritte nicht entscheidend. Nach wie vor war das Proteinmuster sehr komplex und eine konkrete Bandenzuordnung konnte noch nicht getroffen werden. Warum die Chromatographien einander nicht ergänzten, mag kontrovers diskutiert werden, da die CoA-Matrix ebenfalls kationenaustauschende Eigenschaften besitzt und sich andere Enzyme bzw. Proteine im Golgi-Apparat ebenfalls nukleotidabhängig verhalten (ABEIJON *et al.*, 1997; HIRSCHBERG *et al.*, 1998; PUGLIELLI *et al.*, 1999b, PUGLIELLI *et al.*, 1999a; PUGLIELLI und HIRSCHBERG, 1999; ERNST und OEHRLEIN, 1999; KEENAN, 1998; MORRE, 1998). Als abrundende Chromatographie wäre eine zweite auf Gangliosiden als Epitop basierende Affinitätsmatrix von hohem Wert, die allerdings erst konstruiert werden müßte.

Ein anderer Gesichtspunkt ist über die Technik der Reinigung hinaus die Stabilisierung des Enzyms während der Reinigung, da die Ausbeute schon nach den ersten Schritten mit wenigen Prozenten äußerst schwach ist. Zusätze in den Chromatographiepuffern wie 2-Mercaptoethanolamin oder DTT sind in Erwägung zu ziehen. Saccharose oder Glycerin haben sich zwar für eine geringe Aktivitätssteigerung bewährt, üben jedoch einen störenden Einfluß bei der Durchführung des Enzymtests aus, weshalb auf eine Zugabe dieser Substanzen verzichtet werden sollte. Nach einer Chromatographie können die Fraktionen zur Lagerung bedenkenlos bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder sogar lyophilisiert werden. Die Gegenwart des Detergenzes CHAPS scheint sich in dieser Hinsicht sehr positiv auszuwirken.

4.5 Weitere Untersuchungen

4.5.1 Betrachtungen zur Säurehydrolyse von *O*-azetylierten Sialinsäuren

Während der Arbeit wurden Studien zur Hydrolyse von Sia aus Sialosiden begonnen. Für das Thema dieser Dissertation wichtige Aspekte waren die Zeit, in der *O*-azetylierte Sia aus Oligosialosiden durch Hydrolyse abgespalten wurden und wie stabil sich gleichzeitig die *O*-Azetylgruppen erwiesen. Viele Säuren wurden seither für den ersten Schritt einer Sialinsäureanalyse angewandt und der Trend entwickelte sich vom Einsatz sehr starker Mineralsäuren zu schwachen organischen Säuren. Der pH-Wert für eine schonende Hydrolyse hat sich mit etwa pH 2 schon längere Zeit bewährt, so wurden Schwefel-, Salz-, Ameisen-, Essig- und Propionsäure bei immer diesem pH-Wert genutzt. Trotz des gleichen pH-Wertes unterscheiden sich die einzelnen Säuren in ihrem Verhalten beträchtlich gegenüber der Sialat-*O*-Azetylierung. Essig- und Propionsäure sind diesbezüglich deshalb die beste Wahl. Ob der Zusatz von Detergenzien die Hydrolyse beschleunigt, wie dies im Falle der Hydrolyse von Gangliosiden aus Gewebe mit SDS berichtet

worden war (MATTOO und ROSEMAN, 1997), konnte für die Hydrolyse von Meerschweinchenserum in Gegenwart von CHAPS nicht bestätigt werden. Die zitierte Referenz (MATTOO und ROSEMAN, 1997) zielte allerdings auch nur auf eine möglichst hohe Gesamtausbeute von Sia, ohne Rücksicht auf eventuelle Sialat-*O*-Azetylierung. Daß die Art der glykosidischen Bindung oder das Aglykon des Glykokonjugats während der Hydrolyse von Bedeutung ist, konnte jedenfalls bestätigt werden. So ist es hinlänglich bekannt, daß α 2,8- oder α 2,9-gebundene Sia sehr hydrolyseempfindlich sind und sich schon bei Raumtemperatur in schwach azidem Medium langsam zersetzen. Eine Sonderstellung nimmt hier das einzig bekannte, stabile β -Anomer einer glykosidisch gebundenen Sia im CMP-Neu5Ac ein, die wohl die empfindlichste glykosidische Sia-Bindung darstellt. Doch selbst innerhalb einer Glykokonjugatgruppe, z.B. der Ganglioside, muß mit unterschiedlichem Verhalten während der Säurehydrolyse gerechnet werden, so daß einige Ganglioside ihre maximale Hydrolyseausbeute schon sehr viel früher erreichen als andere Vertreter. Als Konsequenz ergibt sich die Notwendigkeit, in Vorversuchen die optimalen säurehydrolytischen Bedingungen für jede individuell zu untersuchende Substanz zu ermitteln. Stabilitätstests mit freien *O*-azetylierten Sia unter den gegebenen Bedingungen bestätigten die in der Literatur erzielten Fortschritte bezüglich der Wahl der Säure. Hier sind eindeutig Essigsäure und Propionsäure die Reagenzien der Wahl. Für die Seitenketten-*O*-Azetylierung, die unter sauren und schwach alkalischen Bedingungen einer *O*-Azetylmigration normalerweise von C-7 zu C-9 ausgesetzt ist, konnte im Anfangsstadium der Hydrolyse eine Zunahme der 8-*O*-Azetylierung und in geringem Maße der 7-*O*-Azetylierung beobachtet werden, was einer *O*-Azetylmigration entgegen der bisherigen Erkenntnis entsprach. Allerdings war der Effekt nur schwach ausgeprägt. Insgesamt konnte aus diesen Studien abgeleitet werden, daß eine Hydrolyse *O*-azetylierter Sia nur ein Kompromiß aus optimaler Ausbeute und minimalem Verlust an *O*-Azetylierung sein kann, da mit Beginn jeder Säurehydrolyse die De-*O*-azetylierung induziert wird und mit der Spaltung der glykosidischen Bindung konkurriert.

4.5.2 Extraktion von Gangliosiden aus Meerschweinchenserum, -leber und -hirn

Die Extraktion der Ganglioside aus Meerschweinchenserum, -leber und -hirn diente sowohl der Überprüfung dieser Substanzen auf Sialat-*O*-Azetylierung, als auch der Korrelation mit in den Enzymtests eingesetzten, aktiven Gangliosiden. Eine *O*-Azetylierung konnte in keiner der Gangliosidfraktionen gefunden werden. Hirabayashi *et al.* fanden 1983 in der Niere des Meerschweinchens 9-*O*-Ac-GM3 als neues Gangliosid (HIRABAYASHI *et al.*, 1983). Möglich ist natürlich eine gewebespezifische Expression dieses Gangliosids, denn interessanterweise wurde bei der Sia-Analyse der Niere auch ein kleiner Teil an Neu5,9Ac₂ gefunden. Die Konzentration von Neu4,5Ac₂ war dagegen noch geringer. Die Ergebnisse sind von Bedeutung, weil bei den

bisherigen Untersuchungen eindeutig keine 9-*O*-Azetylierung gefunden werden konnte und die in den isolierten Meerschweinchenleber-Golgi-Membranen untersuchte *O*-Azetyltransferase nachgewiesenermaßen nur regioselektiv die Position 4 *O*-azetylierte. Wie zu erwarten war die Gangliosidvielfalt im Gehirn des Meerschweinchens am größten. Gefunden wurden neben vier nicht identifizierten Gangliosiden die Ganglioside GM2, GM3, GD1a, GD1b und GT1b. Im Serum konnten nur drei Ganglioside gefunden werden, die zwei Hauptkomponenten GD3 und GM3 und in niedriger Konzentration das Gangliosid GM2. Für Lebergewebe war die Analyse einfach, wurde dort lediglich das Monosialogangliosid GM3 gefunden, das anscheinend auch als vorrangiges Gangliosid in Golgi-Membranen vorkommt, da es hauptsächlich endogen 4-*O*-azetyliert werden konnte. Damit decken die zugeordneten Ganglioside auch die in der Literatur für Meerschweinchengewebe oder -zellen beschriebenen Ganglioside ab. So wurde GM3 in der Nebennierendrüse (SEKINE *et al.*, 1984), GM1 im "endoplasmatic sac" (MANCINI *et al.*, 1995), GD1a in B-Zellen (ALEJANDRO *et al.*, 1984) und GT1b und ein GQ-Gangliosid im Stirnhirn (FERRETTI und BORRONI, 1986) gefunden. Nur GM4 wurde zusätzlich in der Nebennierenrinde beschrieben. Letztendlich war dieses Ergebnis für die Akzeptorspezifität der 4-OAT von nur nebensächlicher Bedeutung, waren doch nach anfänglichen Erfolgen mit dem Gangliosid GD3 auch die meisten anderen getesteten Ganglioside von großem Wert für den Einsatz im Enzymtest. Bemerkenswert war nur die Passivität des Monosialogangliosids GM1b, das sich nicht 4-*O*-azetylieren ließ und eine Parallele zur Resistenz dieses Gangliosids gegenüber der Sialidase aus *Clostridium perfringens* erkennen läßt. Die Sialidase kann die intern gebundene Neu5Ac aus GM1b aufgrund sterischer Hinderung nicht abspalten (CORFIELD *et al.*, 1985).

Alle erzielten Ergebnisse bezüglich der isolierten Ganglioside sind noch nicht durch Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen abgesichert und aus diesem Grunde auch nicht endgültig.

4.5.3 Sialinsäuremuster verschiedener Gewebe und Korrelation des Serum-Neu4,5Ac₂-Gehalts mit der 4-OAT-Aktivität in Golgi-Membranensolubilisat

Es war beachtlich, daß in den untersuchten Proben vom Meerschweinchen der Neu4,5Ac₂-Gehalt im Serum mit 30 %-40 % mit Abstand am höchsten war und in Gewebe aus Colon, Milz und Niere fast vollständig fehlte. Die Leber hatte im Vergleich zum Serum immerhin noch etwa 10 % Neu4,5Ac₂ aufzuweisen. Die Konzentration in den Leber-Golgi-Membranen war mit 18 % fast doppelt so hoch. Das Sialinsäuremuster für die einzelnen Zellbestandteile kann sich folglich deutlich unterscheiden. Ein hoher Gehalt an Neu4,5Ac₂ im Serum könnte auf die Schutzfunktion dieser Sia vor viralen Infektionen zurückzuführen sein. Zwar haben Pritchett *et al.* Pritchett, 1989 und Hanaoka *et al.* Hanaoka, 1989 gefunden, daß eine Sialat-4-*O*-Azetylierung für die

Schutzfunktion des α_2 -Makroglobulins in Pferd und Meerschweinchen vor Influenza A- und B-Viren keine Rolle spielt, doch konnten Matrosovich *et al.* (MATROSOVICH *et al.*, 1998) beweisen, daß die Virulenz eines Pferde-Influenza-Virus erst durch eine Mutation ausgelöst wurde, die eine Anbindung der Neuraminidase an 4-*O*-azetylierte Sia ermöglichte.

Der Weg, die 4-OAT in der Leber des Meerschweinchens zu suchen, war nach Art der Verteilung der Sia in Geweben des Meerschweinchens der richtige. Wie oben schon berichtet, war das Vorkommen von Neu5,9Ac₂ in der Niere des Meerschweinchens nicht erwartet worden, obwohl ein Bericht in dieser Richtung bereits vorlag. Doch während der gesamten Untersuchungen war dies der einzige Ort, an dem die 9-*O*-Azetylierung neben der dominanten 4-*O*-Azetylierung nachgewiesen werden konnte. Als Ergebnis kann eine 7(9)-OAT nur als marginales Enzym im Meerschweinchen betrachtet werden. Es stellt sich die Frage, ob eine 7(9)-OAT im Verlauf der Entwicklung zu einer 4-OAT "mutieren" kann? Eine ähnliche Situation liegt für Ungulaten wie z.B. Pferde vor, bei denen die 9-*O*-Azetylierung ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle spielt (KAMERLING und VLIEGENTHART, 1975). Die Antwort auf solche Fragen würde bei Kenntnis der Aminosäuresequenzen dieser Enzyme wahrscheinlich gegeben werden.

Der Serum-Neu4,5Ac₂-Spiegel fand im Vorfeld der enzymatischen Untersuchungen ein besonderes Interesse. Es war möglich, den Neu4,5Ac₂-Spiegel des Serums mit der Enzymaktivität im Golgi-Membranensolubilisat in Beziehung zu bringen, so daß schon am lebenden Meerschweinchen eine Prognose über die 4-OAT-Aktivität abgegeben werden kann. Der Neu4,5Ac₂-Gehalt des Serums lag normalerweise bei 30 %-40 % und konnte auf bis unter 10 % abfallen. In letzterem Fall war auch keine 4-OAT-Aktivität mehr festzustellen. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob die Expression einer aktiven 4-OAT jahreszeitlich bedingt reguliert wird, da die meisten Tiere, die während der Frühlings- und Sommermonate betrachtet wurden, eine bei weitem schlechtere 4-OAT-Aktivität zeigten als die Tiere der Herbst- und Wintermonate. Wie schon zuvor beschrieben, kann eine allgemeingültige Aussage zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden, weil eine zuverlässige Statistik fehlt.

Eine andere Möglichkeit der Regulation der 4-OAT-Aktivität wurde durch die Entdeckung der Co-Faktorproblematik aufgeworfen. So ist es durchaus denkbar, daß die Regulation des Co-Faktorspiegels eine Regulation der 4-OAT nach sich zieht, eine Variante, die in biochemischen Stoffwechselwegen nicht unbekannt ist.

5 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit, das "*Studium zur enzymatischen 4-O-Azetylierung der N-Azetylneuraminsäure in der Leber des Meerschweinchens*" während der Diplomarbeit, wurde mit großem Erfolg fortgeführt. Ohne sich an anderwärts publizierten Ergebnissen orientieren zu können, wurden vollkommen neue Strategien verfolgt und brachten Ergebnisse hervor, die durchaus als wegweisend für die Erforschung der O-Azetyltransferasen beschrieben werden dürfen.

Es wurden verschiedene, gut funktionierende Enzymtests entwickelt. Dabei wurde schließlich durch neue exogene Substrate ein sehr empfindliches, gut reproduzierbares, schnelles und relativ unempfindliches Testsystem ausgearbeitet, das universell einsetzbar ist, mit kleinsten Inkubationsvolumina auskommt und sich hervorragend für das Ziel der Enzymreinigung eignet.

Bezüglich der Substratspezifitäten konnten bisher nur Ganglioside überzeugen. Alle anderen Substrate, seien es freie Sialinsäuren, Oligosaccharide oder Proteine waren nur unbefriedigende Substrate. Wahrscheinlich muß es sich hierbei um einen *in vitro*-Effekt handeln, da es nachweislich hoch Sialat-4-O-azetylierte Meerschweinchenglykoproteinstrukturen gibt (HANAOKA *et al.*, 1989). Der Golgi-Apparat ist darüberhinaus eine wichtige Sortierungs- und Sialylierungsmaschinerie für prozessierte Proteine. Eine Sialat-4-O-Azetylierung endogener Glykoproteine ist in dieser Organelle der Zelle deshalb am wahrscheinlichsten.

Die Produktidentifikation konnte trotz großer Schwierigkeiten für das Gangliosid GD3 erfolgreich durchgeführt werden. Alle O-azetylierten Sialoside wurden an C-4-OH der Sia azetyliert. Die Frage, warum sich die Hydrolyse von GD3 wegen des auftretenden O-Azetyl-Verlusts als höchst problematisch erwies, blieb offen.

Neu5,9Ac₂ und 9-O-Ac-GD3 wurden genauso gut durch die 4-OAT umgesetzt wie die nicht O-azetylierten Analoga. Eine schon vorhandene Azetylierung an C-4 der Sia verhinderte natürlich die Umsetzung.

Die Aufarbeitung der Meerschweinchenleber durch Homogenisation mit anschließender diskontinuierlicher Saccharosedichtegradientenzentrifugation eignete sich hervorragend zur schnellen und sauberen Präparation von Golgi-Membranen. Schon an dieser Stelle wurde ein großer Reinigungseffekt erzielt, wie es deutlich an der Verteilung der spezifischen Sialyltransferase- und 4-OAT-Aktivität in verschiedenen Schichten des Saccharosegradienten gezeigt wurde. Die mit Abstand höchsten Aktivitäten fanden sich in der Golgi-Membranen-Fraktion. Zugleich wurde dabei eine Co-Lokalisation beider Enzyme im Golgi-Apparat bewiesen. Während der Aufarbeitung, vornehmlich während der Homogenisation des Lebergewebes, kam es zu un-

natürlichen Formationen des Golgi-Apparates, so daß auch die membrangebundene Sialyltransferase und 4-OAT exogene Substrate umsetzen konnten, die die Membranen ansonsten nicht passieren könnten.

Obwohl Ganglioside die bevorzugten exogenen Akzeptoren waren, konnten weder in Meerschweinchenhirn, -leber oder -serum *O*-azetylierte Ganglioside gefunden werden. In Leber und Golgi-Membranen war GM3 als einziges Gangliosid enthalten, ein Vorläufermolekül für die Ganglioside der a-, b- und c-Serie.

Die Parameter für die optimale Enzymaktivität wurden neu bestimmt, um eine höchsteffektive Enzymreinigung zu gewährleisten. Dabei kristallisierten sich, was die Salzkonzentration, den pH-Wert und die Zeitabhängigkeit betraf, einige Unterschiede im Verhalten zum membrangebundenen Enzym heraus.

Kinetische Untersuchungen offenbarten ebenfalls Unterschiede zum membrangebundenen Enzym. So war die Affinität der solubilisierten 4-OAT nicht mehr so groß zum Substrat AcCoA, wie die der membrangebundenen 4-OAT. Bis auf GM3 zeigten alle kinetisch getesteten Ganglioside eine hohe katalytische Effizienz. Ob GD1b aufgrund seiner zwei α 2,3-gebundenen Sia ein besserer Akzeptor war als GD1a und vielleicht an beiden Sia 4-*O*-azetyliert wird, ist eine interessante Frage, die kinetischen Betrachtungen und das chromatographische Laufverhalten deuten zumindestens darauf hin.

Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten für CoA ergab eine rein kompetitive Inhibition im mikromolaren Bereich und unterschied sich von der gemischt kompetitiven Inhibition für das membrangebundene Enzym. Auch andere AcCoA-Derivate zeigten ein potentes Inhibitionsverhalten. Selbst das im Vergleich zum AcCoA einfach aufgebaute Adenosinnukleotid 3',5'-ADP inhibierte noch stark. Daß die Inosinnukleotide, und zwar in der Reihenfolge IMP, IDP, ITP, auch noch relativ stark inhibierten, AMP, ATP jedoch nicht, läßt darauf schließen, daß die Aminofunktion in Adenosinnukleotiden keinen entscheidenden Einfluß auf die Enzymbindung hat, wohl aber die Phosphorylierung der Ribose. Insgesamt läßt sich urteilen, daß der Nukleotidteil des AcCoA-Moleküls für die Bindung an die 4-OAT bedeutend ist. Ein besonderer Inhibitor war 3'-Dephospho-CoA, weil es als Substrat fungierte und auf Kosten der 4-*O*-Ac-GD3-Synthese azetyliert wurde, allerdings erst ab einer Grenzkonzentration für eingesetztes 3'-Dephospho-CoA.

Die 4-OAT-Aktivität wird in solubilisierten Golgi-Membranen von einer Phosphataseaktivität begleitet, die in AcCoA die 3'-Phosphatgruppe abspaltet und somit 3'-Dephospho-AcCoA bildet. Die Phosphataseaktivität konnte während der Enzymreinigungsversuche von der 4-OAT abgetrennt werden. Phosphationen inhibierten die Phosphataseaktivität weitgehend.

Als absolutes Novum wurde eine Co-Faktorabhängigkeit für die 4-OAT festgestellt. Der Co-Faktor ist kleiner als 10 kDa, hitzestabil und hydrophil.

Die 4-OAT ließ sich durch Affinitätschromatographie oder Kationenaustauschchromatographie anreichern. Beide Chromatographien gekoppelt verbesserten die Anreicherung nicht. Obwohl der Triazinfarbstoff Cibacron Blue F3G-A für die Affinitätschromatographie von nukleotidabhängigen Enzymen geeignet ist und der Farbstoff selbst eine gute inhibitorische Wirkung zeigte, war das Ergebnis einer solchen Chromatographie unbedeutend.

In einer begonnenen Säurehydrolysestudie wurde gezeigt, daß Propionsäure die schonendste Variante einer Säurehydrolyse darstellt und einer Sialat-*O*-Azetylierung den optimalen Schutz bietet. Der Zusatz von 20 mM CHAPS beschleunigte die Säurehydrolyse von Sia aus Meerschweinchenserum nicht. Neu5,9Ac₂ zeigte unter säurehydrolytischen Bedingungen teilweise die Eigenschaft der *O*-Azetylgruppenwanderung von Position C-9 zu C-8 und in geringerem Ausmaß auch zu C-7, also einer Migrationstendenz entgegen der sonst üblichen Richtung "down the chain".

Während der Arbeit wurde in solubilisierten Golgi-Membranen teilweise Inaktivität bezüglich der 4-OAT festgestellt, die eher im Frühling/Sommer als im Herbst/Winter auftrat. Ein Problem, das zusätzlich zu einer Verzögerung der Arbeit führte. Als Indikator einer aktiven 4-OAT in Golgi-Membranen wurde der Neu4,5Ac₂-Gehalt im Serum erkannt. Ein 30-40 prozentiger Neu4,5Ac₂-Gehalt war mit einer guten 4-OAT-Aktivität gekoppelt, ein unter 10 % liegender Neu4,5Ac₂-Gehalt mit einer schlechten oder fehlenden 4-OAT-Aktivität. Zwei bis drei µl Serum waren dabei für eine solche Bestimmung vollkommen ausreichend.

Als Fazit läßt sich formulieren, daß der Reinigung der ersten *O*-Azetyltransferase nichts mehr im Wege steht. Erste sehr vielversprechende Ansätze sind vorgestellt worden, die nun ausgebaut werden können. Der Schutz des Enzyms gegen Oxidation muß zugunsten einer besseren Ausbeute aktiven Proteins besonders ins Auge gefaßt werden. Eine zweite Affinitätschromatographie auf der Basis von Gangliosiden würde die Reinigung enorm beschleunigen. Aus einer 30 g schweren Meerschweinchenleber können etwa 10–20 mg solubilisiertes Golgi-Membran-Protein gewonnen werden. Vorsichtig geschätzt wären für eine Reinigung 100-200 mg Ausgangsmaterial notwendig. Eine 4-OAT-Reinigung wird den Weg für eine Reihe neuer Untersuchungsziele ebnen. Molekularbiologische Studien werden die Expression in bakteriellen Systemen in einer Quantität ermöglichen, die zu Kristallisationsansätzen und über Röntgenstrukturanalysen zu dreidimensionalen Vorstellungen über das Enzym führen. Immunologische Techniken werden monoklonale Antikörper hervorbringen, die eine Detektion der Verteilung der 4-OAT in Gewe-

ben ermöglicht. Genetische Vergleichsstudien werden die verwandschaftlichen Verhältnisse mit anderen Sialat-*O*-azetyltransferasen klären.

Der Durchbruch ist geschafft und die Grundlagen der wissenschaftlichen Erforschung der Sialat-*O*-azetyltransferasen sind gelegt.

Tabelle 5: Wichtige Eigenschaften der 4-OAT

Parameter	membrangebundene 4-OAT	solubilisierete 4-OAT
K_M AcCoA (endog. Substrat)	0.6 μM	n.b.
V_{max} AcCoA (endog. Substrat)	19.9 pmol/min × mg Protein	n.b.
K_M AcCoA (exogen mit GD3)	n.b.	3.6 μM
V_{max} AcCoA (exogen mit GD3)	n.b.	215 pmol/min × mg Protein
K_M GM3	n.b.	8.4 μM
V_{max} GM3	n.b.	235 pmol/min × mg Protein
K_M GD3	n.b.	1.2 μM
V_{max} GD3	n.b.	1310 pmol/min × mg Protein
K_M GD1b	n.b.	2.2 μM
V_{max} GD1b	n.b.	2136 pmol/min × mg Protein
K_M GD1a	n.b.	2.2 μM
V_{max} GD1a	n.b.	1385 pmol/min × mg Protein
K_i CoA (endogenes Substrat)	4.2 μM	n.b.
K_i CoA (exogen mit GD3)	n.b.	14.8 μM
linearer Inkubationsbereich	5 min	10 min für Neu5Ac 15-20 min für GD3

Parameter	membrangebundene 4-OAT	solubilisierete 4-OAT
CHAPS-Optimum	n.b.	20 mM (endogen) 14 mM (Neu5Ac) ≥ 14 mM (GD3)
Kaliumchloridoptimum	90 mM	ca. 55 mM (bis 200 mM reversible Inhibition)
Phosphatoptimum	70 mM	ca 55 mM
pH-Optimum	6.7	5.7

n.b. = nicht bestimmbar

Tabelle 6: Übersicht wichtiger Inhibitoren der 4-OAT

Inhibitor	solubilierte 4-OAT
<i>p</i> -CMB (1 mM)	100 %
CoA (13 μ M)	50 %
Desulfo-CoA (13 μ M)	50 %
3'-Dephospho-CoA ($\geq 22 \mu$ M)	50 %
3',5'-ADP (1 mM)	80 %
IMP (1 mM)	16 %
IDP (1 mM)	30 %
ITP (1 mM)	58 %
AMP (1 mM)	0 %
ATP (1 mM)	20 %
NADH (1 mM)	0 %
NADPH (1 mM)	18 %
PLP (1 mM)	75 %
DIDS (125 μ M)	50 %
F3G-A (400 μ M)	65 %

6 Literatur

- Abeijon, C., Mandon, E. C., Hirschberg, C. B., *Trends Biochem Sci*, **1997**, 22, 203-207.
"Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus".
- Accili, D., Gabrielli, M. G., Menghi, G., Materazzi, G., *Histol. Histopathol.*, **1996**, 11, 647-658.
"Histoenzymological detection of sialic acids in the rodent salivary glands".
- Alejandro, R., Shienvold, F. L., Hajek, S. A., Pierce, M., Paul, R., Mintz, D. H., *J Clin Invest*, **1984**, 74(1), 25-38.
"A ganglioside antigen on the rat pancreatic B cell surface identified by monoclonal antibody R2D6".
- Araujo, H., Menezes, M., Mendezotero, R., *Eur. J. Cell Biol.*, **1997**, 72, 202-213.
"Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization in growth cones and neurites".
- Ashwell, G., Morell, A., *Biochem Soc Symp*, **1974**, (40), 117-124.
"The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins".
- Barnes, Y. C., Skelton, T. P., Stamenkovic, I., Sgroi, D. C., *Blood*, **1999**, 93, 1245-1252.
"Sialylation of the sialic acid binding lectin sialoadhesin regulates its ability to mediate cell adhesion".
- Bergwerff, A. A., Hulleman, S. H., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F., Shaw, L., Reuter, G., Schauer, R., *Biochimie*, **1992**, 74(1), 25-37.
"Nature and biosynthesis of sialic acids in the starfish *Asterias rubens*. Identification of sialo-oligomers and detection of S-adenosyl-L-methionine: N-acylneuraminate 8-O-methyltransferase and CMP-N-acetylneuraminate monooxygenase activities".
- Bora, R. S., Ichikawa, S., Kanamori, A., Hirabayashi, Y., *FEBS Lett.*, **2000**, 473, 169-172.
"Genomic structure and promoter analysis of putative mouse acetyl-CoA transporter gene".
- Brito, R. M., Vaz, W. L., *Anal Biochem*, **1986**, 152(2), 250-255.
"Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine".
- Butor, C., Diaz, S., Varki, A., *J Biol Chem*, **1993b**, 268(14), 10197-10206.
"High level O-acetylation of sialic acids on N-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7- and 9-O-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation".
- Butor, C., Higa, H. H., Varki, A., *J Biol Chem*, **1993a**, 268(14), 10207-10213.
"Structural, immunological, and biosynthetic studies of a sialic acid-specific O-acetyltransferase from rat liver".
- Capasso, J. M., Hirschberg, C. B., *Biochim Biophys Acta*, **1984**, 777(1), 133-139.
"Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into Golgi apparatus vesicles".
- Constantine-Paton, M., Blum, A. S., Mendez-Otero, R., Barnstable, C. J., *Nature*, **1986**, 324(6096), 459-462.
"A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina [published erratum appears in Nature 1987 Jan 15-21:284]".
- Corfield, A. P., Ferreira, d. A., Wember, M., Schauer, R., *Eur J Biochem*, **1976**, 68(2), 597-610.
"The metabolism of O-acyl-N-acylneuraminic acids. Biosynthesis of O-acylated sialic acids in bovine and equine submandibular glands".

- Corfield, A. P., Sander-Wewer, M., Veh, R. W., Wember, M., Schauer, R., *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1986**, 367(5), 433-439.
"The action of sialidases on substrates containing *O*-acetylsialic acids".
- Corfield, A. P., Schauer, R., Dorland, L., Vliegenthart, J. F., Wiegandt, H., *J Biochem (Tokyo)*, **1985**, 97(2), 449-461.
"Studies on the interaction of *Clostridium perfringens* sialidase with sialic acid linked to the internal galactose in monosialogangliosyl ceramide".
- Diaz, S., Higa, H. H., Varki, A., *Methods Enzymol*, **1989**, 179, 416-422.
"Glycoprotein sialate 7(9)-*O*-acetyltransferase from rat liver Golgi vesicles".
- Dmitriev, B. A., Backinowsky, L. V., Knirel, Y. A., Kochetkov, N. K., *Eur J Biochem*, **1977**, 78(2), 381-387.
"Somatic antigens of *Shigella*. The structure of the specific polysaccharide chain of *Shigella dysenteriae* type 5 lipopolysaccharide".
- Edman, P., Begg, G., *Eur J Biochem*, **1967**, 1(1), 80-91.
"A protein sequenator".
- Engstler, M., Wirtz, E., Cross, G. A. M., *Glycobiology*, **1997**, 7, 955-964.
"Generation of constitutive and inducible trans-sialylation dominant-negative phenotypes in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*".
- Ernst, B., Oehrlein, R., *Glycoconjugate J*, **1999**, 16, 161-170.
"Substrate and donor specificity of glycosyl transferases".
- Faillard, H., *Trends Biochem Sci*, **1989**, 14(6), 237-241.
"The early history of sialic acids".
- Faillard, H., Schauer, R., in: *Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function*, A. Gottschalk (ed.), Elsevier, Amsterdam, **1972**, 1246-1267.
- Ferretti, P., Borroni, E., *J Neurochem*, **1986**, 46(6), 1888-1894.
"Putative cholinergic-specific gangliosides in guinea pig forebrain".
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., *J Biol Chem*, **1957**, 226, 497-509.
"A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues".
- Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J. E., Dell, A., Klock, J. C., *J Biol Chem*, **1984**, 259(17), 10925-10935.
"Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes".
- Fukuda, M. N., Dell, A., Oates, J. E., Fukuda, M., *J Biol Chem*, **1985**, 260(11), 6623-6631.
"Embryonal lactosaminoglycan. The structure of branched lactosaminoglycans with novel disialosyl (sialyl alpha 2----9 sialyl) terminals isolated from PA1 human embryonal carcinoma cells".
- Gamian, A., Kenne, L., Mieszala, M., Ulrich, J., Defaye, J., *Eur J Biochem*, **1994**, 225(3), 1211-1220.
"Structure of the *Escherichia coli* O24 and O56 *O*-specific sialic-acid-containing polysaccharides and linkage of these structures to the core region in lipopolysaccharides".
- Gamian, A., Romanowska, E., Ulrich, J., Defaye, J., *Carbohydr Res*, **1992**, 236:195-208, 195-208.
"The structure of the sialic acid-containing *Escherichia coli* O104 *O*-specific polysaccharide and its linkage to the core region in lipopolysaccharide".
- Gradl, G., Faust, D., Oesch, F., Wieser, R. J., *Curr Biol*, **1995**, 5(5), 526-535.
"Density-dependent regulation of cell growth by contactinhibin and the contactinhibin receptor".
- Hanaoka, K., Pritchett, T. J., Takasaki, S., Kochibe, N., Sabesan, S., Paulson, J. C., Kobata, A., *J Biol Chem*, **1989**, 264(17), 9842-9849.
"4-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid in the *N*-linked carbohydrate structures of equine and guinea pig alpha 2-macroglobulins, potent inhibitors of influenza virus infection".

- Hanasaki, K., Powell, L. D., Varki, A., *J Biol Chem*, **1995**, 270(13), 7543-7550.
"Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin".
- Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Furuhata, K., Ogura, H., Nakamura, M., *Anal Biochem*, **1989**, 179(1), 162-166.
"Determination of mono-*O*-acetylated *N*-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography".
- Harms, G., Reuter, G., Corfield, A. P., Schauer, R., *Glycoconjugate J.*, **1996**, 13, 621-630.
"Binding specificity of influenza C-virus to variably *O*- acetylated glycoconjugates and its use for histochemical detection of *N*-acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid in mammalian tissues".
- Hattori, M., Horiuchi, R., Hosaka, K., Hayashi, H., Kojima, I., *J Biol Chem*, **1995**, 270(14), 7858-7863.
"Sialyllactose-mediated cell interaction during granulosa cell differentiation. Identification of its binding proteins".
- Herrler, G., Reuter, G., Rott, R., Klenk, H. D., Schauer, R., *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1987**, 368(5), 451-454.
"*N*-acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid, the receptor determinant for influenza C virus, is a differentiation marker on chicken erythrocytes".
- Heukeshoven, J., Dernik, R., **1986**, 92-97.
"Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelelen.".
- Higa, H. H., Rogers, G. N., Paulson, J. C., *Virology*, **1985**, 144(1), 279-282.
"Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing *N*-acetyl-, *N*-glycolyl-, and *N,O*- diacetylneuraminic acids".
- Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsumoto, M., Ueda, S., Kato, S., *Cancer Res*, **1985**, 45(8), 3796-3802.
"Characterization of *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer".
- Hirabayashi, Y., Li, Y. T., Li, S. C., *FEBS Lett*, **1983**, 161(1), 127-130.
"Occurrence of a new hematoside in the kidney of guinea pig".
- Hirmo, S., Kelm, S., Iwersen, M., Hotta, K., Goso, Y., Ishihara, K., Suguri, T., Morita, M., Wadstrom, T., Schauer, R., *FEMS Immunol Med Microbiol*, **1998**, 20, 275-281.
"Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins".
- Hirmo, S., Kelm, S., Schauer, R., Nilsson, B., Wadstrom, T., *Glycoconjugate J.*, **1996**, 13, 1005-1011.
"Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to alpha-2,3- linked sialic acids".
- Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., Abeijon, C., *Annu Rev Biochem*, **1998**, 67, 49-69.
"Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus".
- Hirst, G. K., *Science*, **1941**, 94, 22-23.
"Agglutination of red blood cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.".
- Hjelmeland, L. M., Nebert, D. W., Osborne, J. C. J., *Anal Biochem*, **1983**, 130(1), 72-82.
"Sulfobetaine derivatives of bile acids: nondenaturing surfactants for membrane biochemistry".
- Holmes, E. H., Ostrander, G. K., Hakomori, S., *J Biol Chem*, **1986**, 261(8), 3737-3743.
"Biosynthesis of the sialyl-Lex determinant carried by type 2 chain glycosphingolipids

- (IV3NeuAcIII3FucnLc4, VI3NeuAcV3FucnLc6, and VI3NeuAcIII3V3Fuc2nLc6) in human lung carcinoma PC9 cells".
- Horstkorte, R., Nohring, S., Wiechens, N., Schwarzkopf, M., Danker, K., Reutter, W., Lucka, L., *Eur J Biochem*, **1999**, 260, 923-927.
"Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase".
- Hubl, U., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A., Schauer, R., *J Biochem Tokyo*, **2000**, 127, 1021-1031.
"Studies on the specificity and sensitivity of the influenza C virus binding assay for 9-*O*-acetylated sialic acids and its application to human melanomas".
- Hucho, F., Tsetlin, V., **1998**, 1. Auflage(6), 103-130.
"Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen".
- Inoue, S., Iwasaki, M., Ishii, K., Kitajima, K., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1989**, 264(31), 18520-18526.
"Isolation and structures of glycoprotein-derived free sialooligosaccharides from the unfertilized eggs of *Tribolodon hakonensis*, a dace. Intracellular accumulation of a novel class of biantennary disialooligosaccharides".
- Iwasaki, M., Inoue, S., Troy, F. A., *J Biol Chem*, **1990**, 265(5), 2596-2602.
"A new sialic acid analogue, 9-*O*-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha-2,8-linked *O*-acetylated poly(*N*-glycolylneuraminyl) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs".
- Iwersen, M., Vandamme-Feldhaus, V., Schauer, R., *Glycoconjugate J*, **1998**, 15, 895-904.
"Enzymatic 4-*O*-acetylation of *N*-acetylneuraminic acid in guinea-pig liver".
- Jancik, J., Schauer, R., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **1974**, 355(4), 395-400.
"Sialic acid--a determinant of the life-time of rabbit erythrocytes".
- Jancik, J., Schauer, R., Andres, K. H., *Cell tissue res.*, **1978**, 186, 209-226.
"Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes. Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects".
- Jancik, J., Schauer, R., Streicher, H. J., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **1975**, 356(8), 1329-1331.
"Influence of membrane-bound *N*-acetylneuraminic acid on the survival of erythrocytes in man".
- Jass, J. R., Robertson, A. M., *Pathol Int*, **1994**, 44(7), 487-504.
"Colorectal mucin histochemistry in health and disease: a critical review".
- Kamerling, J. P., Dorland, L., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F., Messer, M., Schauer, R., *Carbohydr Res*, **1982**, 100:331-40, 331-340.
"Structural studies of 4-*O*-acetyl-alpha-*N*-acetylneuraminyl-(2 goes to 3)-lactose, the main oligosaccharide in echidna milk".
- Kamerling, J. P., Schauer, R., Shukla, A. K., Stoll, S., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F., *Eur J Biochem*, **1987**, 162(3), 601-607.
"Migration of *O*-acetyl groups in *N,O*-acetylneuraminic acids".
- Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F., *Carbohydr Res*, **1975**, 41, 7-17.
"Identification of *O*-cetylated *N*-acetylneuraminic acids by mass spectrometry".
- Kanamori, A., Inoue, S., Iwasaki, M., Kitajima, K., Kawai, G., Yokoyama, S., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1990**, 265(35), 21811-21819.
"Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo(deaminated neuraminic acid) structure in *O*-linked glycan chains".

- Kanamori, A., Nakayama, J., Fukuda, M. N., Stallcup, W. B., Sasaki, K., Fukuda, M., Hirabayashi, Y., *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**, 94, 2897-2902.
"Expression cloning and characterization of a cDNA encoding a novel membrane protein required for the formation of *O*-acetylated ganglioside: A putative acetyl-CoA transporter".
- Karađali, S., Kirmizigul, S., Deveci, R., *INVERTEBR REPROD DEV*, **1999**, 35, 225-229.
"Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)".
- Karađali, S., Kirmizigul, S., Deveci, R., Deveci, O., Onat, T., Gurcu, B., *Tissue Cell*, **1997**, 29, 315-321.
"Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)".
- Keenan, T. W., *Histochemistry Cell Biol*, **1998**, 109, 505-516.
"Biochemistry of the Golgi apparatus".
- Kelm, A., Shaw, L., Schauer, R., Reuter, G., *Eur J Biochem*, **1998**, 251, 874-884.
"The biosynthesis of 8-*O*-methylated sialic acids in the starfish *Asterias rubens* - Isolation and characterisation of S-adenosyl-L-methionine:sialate-8-*O*-methyltransferase".
- Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H. J., Streng, K., Schauer, R., *Eur J Biochem*, **1998**, 255, 663-672.
"Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues".
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M. T., Tang, S., de Bellard, M. E., Schnaar, R. L., Mahoney, J. A., Hartnell, A., Bradfield, P., et al., *Curr Biol*, **1994a**, 4(11), 965-972.
"Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily".
- Kelm, S., Schauer, R., Crocker, P. R., *Glycoconjugate J.*, **1996**, 13, 913-926.
"The sialoadhesins - A family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily".
- Kelm, S., Schauer, R., Manuguerra, J. C., Gross, H. J., Crocker, P. R., *Glycoconj J*, **1994b**, 11(6), 576-585.
"Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22".
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., *Anal Biochem*, **1992**, 202(1), 25-34.
"Detection, isolation, and characterization of oligo/poly(sialic acid) and oligo/poly(deaminoneuraminic acid) units in glycoconjugates".
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., Troy, F. A., Cho, J. W., Lennarz, W. J., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1994**, 269(36), 22712-22718.
"Identification of polysialic acid-containing glycoprotein in the jelly coat of sea urchin eggs. Occurrence of a novel type of polysialic acid structure".
- Klein, A., Roussel, P., *Biochimie*, **1998**, 80, 49-57.
"*O*-acetylation of sialic acids".
- Klein, H. W., Helmreich, E. J., *Curr Top Cell Regul*, **1985**, 26, 281-294.
"The role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase catalysis".
- Kleineidam, R. G., Furuhashi, K., Ogura, H., Schauer, R., *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1990**, 371(8), 715-719.
"4-Methylumbelliferyl- α -glycosides of partially *O*-acetylated *N*-acetylneuraminic acids as substrates of bacterial and viral sialidases"
- Klotz, F. W., Orlandi, P. A., Reuter, G., Cohen, S. J., Haynes, J. D., Schauer, R., Howard, R. J., Palese, P., Miller, L. H., *Mol Biochem Parasitol*, **1992**, 51(1), 49-54.
"Binding of *Plasmodium falciparum* 175-kilodalton erythrocyte binding antigen and invasion of murine erythrocytes requires *N*-acetylneuraminic acid but not its *O*-acetylated form".

- Kluge, A., Reuter, G., Lee, H., Ruch-Heeger, B., Schauer, R., *Eur J Cell Biol*, **1992**, 59(1), 12-20.
"Interaction of rat peritoneal macrophages with homologous sialidase-treated thrombocytes in vitro: biochemical and morphological studies. Detection of *N*-(*O*-acetyl)glycolylneuraminic acid".
- Kniep, B., Claus, C., Peter-Katalinic, J., Monner, D. A., Dippold, W., Nimtz, M., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 30173-30180.
"7-*O*-acetyl-GD3 in human T-lymphocytes is detected by a specific T-cell-activating monoclonal antibody".
- Kniep, B., Flegel, W. A., Northoff, H., Rieber, E. P., *Blood*, **1993**, 82(6), 1776-1786.
"CDw60 glycolipid antigens of human leukocytes: structural characterization and cellular distribution".
- Kogan, G., Brisson, J. R., Kasper, D. L., von Hunolstein, C., Orefici, G., Jennings, H. J., *Carbohydr Res*, **1995**, 277(1), 1-9.
"Structural elucidation of the novel type VII group B Streptococcus capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy".
- Kogan, G., Jann, B., Jann, K., *FEMS Microbiol Lett*, **1992**, 70(2), 135-140.
"Structure of the Escherichia coli 0104 polysaccharide and its identity with the capsular K9 polysaccharide".
- Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Kolb, H., *Exp Cell Res*, **1983**, 148(1), 173-182.
"Receptor-mediated particle uptake by liver macrophages. The galactose-particle receptor mediates uptake via coated and also non-coated structures".
- Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Vogell, W., Kolb, H., *Cell*, **1982**, 29(3), 859-866.
"Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin-mediated endocytosis".
- Ladisch, S., Gillard, B., *Anal Biochem*, **1985**, 146(1), 220-231.
"A solvent partition method for microscale ganglioside purification".
- Laemmli, U. K., *Nature*, **1970**, 227(259), 680-685.
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4".
- Lasky, L. A., *Adv Exp Med Biol*, **1995**, 376:259, 259.
"Sialomucins in inflammation and hematopoiesis".
- Ledeen, R. W., Yu, R. K., *Methods Enzymol*, **1982**, 83, 139-191.
"Gangliosides: structure, isolation, and analysis".
- Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95(12), 6803-6808.
"Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins".
- Lochnit, G., Geyer, R., *Eur J Biochem*, **1995**, 228(3), 805-816.
"Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from Bothrops moojeni venom".
- Lowe, C. R., Pearson, J. C., *Methods Enzymol*, **1984**, 104:97-113, 97-113.
"Affinity chromatography on immobilized dyes".
- Mancini, P., Barbara, M., Santi, P. A., *Acta Otolaryngol (Stockh)*, **1995**, 115(3), 392-395.
"Glycolipidic component of the epithelial cell coat of the endolymphatic sac".
- Mann, B., Klusmann, E., Vandamme-Feldhaus, V., Iwersen, M., Hanski, M. L., Riecken, E. O., Buhr, H. J., Schauer, R., Kim, Y. S., Hanski, C., *Int J Cancer*, **1997**, 72, 258-264.
"Low *O*-acetylation of sialyl-Le(x) contributes to its overexpression in colon carcinoma metastases".

- Manzi, A. E., Dell, A., Azadi, P., Varki, A., *J Biol Chem*, **1990**, 265(14), 8094-8107.
"Studies of naturally occurring modifications of sialic acids by fast-atom bombardment-mass spectrometry. Analysis of positional isomers by periodate cleavage [published erratum appears in *J Biol Chem* 1990 Jul 25;265(21):12749]"
- Matrosovich, M., Gao, P., Kawaoka, Y., *J Virol*, **1998**, 72(8), 6373-6380.
"Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host"
- Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Byramova, N. E., Mochalova, L. V., Golbraikh, A. A., Shenderovich, M. D., Finne, J., Bovin, N. V., *Virology*, **1993**, 196(1), 111-121.
"Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides"
- Mattoo, R. L., Roseman, S., *Anal. Biochem.*, **1997**, 246, 30-33.
"Quantitative determination of sialic acid in the monosialoganglioside, GM(1), by the thiobarbituric acid method"
- Mawhinney, T. P., Chance, D. L., *Anal Biochem*, **1994**, 223(1), 164-167.
"Hydrolysis of sialic acids and *O*-acetylated sialic acids with propionic acid"
- May, A. P., Robinson, R. C., Aplin, R. T., Bradfield, P., Crocker, P. R., Jones, E. Y., *Protein Sci*, **1997**, 6(3), 717-721.
"Expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of a sialic acid-binding fragment of sialoadhesin in the presence and absence of ligand"
- McClelland, L., Hare, R., *Canadian Journal of Public Health*, **1941**, 32, 530-538.
"The adsorption of influenza virus by red cells and a new in vitro method of measuring antibodies for influenza virus in the embryonated egg."
- Menghi, G., Bondi, A. M., Marchetti, L., Gabrielli, M. G., Materazzi, G., *Histol Histopathol*, **1998**, 13, 137-146.
"Sialoglycoconjugate dimorphism of the mouse submandibular gland acinar cells. Ultrastructural evidence by lectin protein A-gold probes and sialidase digestion"
- Menghi, G., Marchetti, L., Bondi, A. M., Materazzi, G., *Eur. J. Morphol.*, **1996**, 34, 181-185.
"Sialylation patterns of the mouse parotid secretory granules. Combined deacetylation, enzymatic degradation and lectin-gold binding"
- Michalski, J. C., in: *Methods on Glycoconjugates*, Verbert, A (ed.), Harwood Academic Publishers, Chur (Schweiz), **1995**, (6), 63-65.
"Gel-Filtration and Thin-Layer Chromatography of Oligosaccharides"
- Milla, M. E., Clairmont, C. A., Hirschberg, C. B., *J Biol Chem*, **1992**, 267(1), 103-107.
"Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the Golgi apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose, and UDP-glucuronic acid transport activities"
- Miyoshi, I., Higashi, H., Hirabayashi, Y., Kato, S., Naiki, M., *Mol Immunol*, **1986**, 23(6), 631-638.
"Detection of 4-*O*-acetyl-*N*-glycolylneuraminyllactosylceramide as one of tumor-associated antigens in human colon cancer tissues by specific antibody"
- Morre, D. J., *Histochemistry Cell Biol*, **1998**, 109, 487-504.
"Cell-free analysis of Golgi apparatus membrane traffic in rat liver"
- Murray, P. A., Levine, M. J., Reddy, M. S., Tabak, L. A., Bergey, E. J., *Infection and Immunity*, **1986**, 53(2), 359-365.
"Preparation of a sialic acid-binding protein from *Streptococcus mitis* KS32AR"
- Müthing, J., Heitmann, D., *Anal Biochem*, **1993**, 208(1), 121-124.
"Nondestructive detection of gangliosides with lipophilic fluorochromes and their employment for preparative high- performance thin-layer chromatography"

Müthing, J., Peter-Katalinic, J., Hanisch, F. G., Neumann, U., *Glycoconj J*, **1991**, 8(5), 414-423.

"Structural studies of gangliosides from the YAC-1 mouse lymphoma cell line by immunological detection and fast atom bombardment mass spectrometry".

Müthing, J., Unland, F., *J Chromatogr B Biomed Appl*, **1994**, 658(1), 39-45.

"Improved separation of isomeric gangliosides by anion-exchange high-performance liquid chromatography".

Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1986**, 261(25), 11550-11557.

"A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs".

Nakamura, T., Urashima, T., Nakagawa, M., Saito, T., *Bba. -Gen. Subjects.*, **1998**, 1381, 286-292.

"Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum".

Neugebauer, J. M., *Methods Enzymol*, **1990**, 182, 239-253.

"Detergents: an overview".

Powell, L. D., Sgroi, D., Sjöberg, E. R., Stamenkovic, I., Varki, A., *J Biol Chem*, **1993**, 268(10), 7019-7027.

"Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition".

Pritchett, T. J., Paulson, J. C., *J Biol Chem*, **1989**, 264(17), 9850-9858.

"Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin".

Puglielli, L., Hirschberg, C. B., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 35596-35600.

"Reconstitution, identification, and purification of the rat liver Golgi membrane GDP-fucose transporter".

Puglielli, L., Mandon, E. C., Hirschberg, C. B., *J Biol Chem*, **1999a**, 274, 12665-12669.

"Identification, purification, and characterization of the rat liver Golgi membrane ATP transporter".

Puglielli, L., Mandon, E. C., Rancour, D. M., Menon, A. K., Hirschberg, C. B., *J Biol Chem*, **1999b**, 274, 4474-4479.

"Identification and purification of the rat liver Golgi membrane UDP-N-acetylgalactosamine transporter".

Regl, G., Kaser, A., Iwersen, M., Schmid, H., Kohla, G., Strobl, B., Vilas, U., Schauer, R., Vlasak, R., *J Virol*, **1999**, 73, 4721-4727.

"The hemagglutinin-esterase of mouse hepatitis virus strain S is a sialate-4-O-acetylerase".

Reuter, G., Pfeil, R., Stoll, S., Schauer, R., Kamerling, J. P., Versluis, C., Vliegthart, J. F., *Eur J Biochem*, **1983**, 134(1), 139-143.

"Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland".

Reuter, G., Schauer, R., *Methods Enzymol*, **1994**, 230, 168-199.

"Determination of sialic acids".

Rogers, G. N., Daniels, R. S., Skehel, J. J., Wiley, D. C., Wang, X. F., Higa, H. H., Paulson, J. C., *J Biol Chem*, **1985**, 260(12), 7362-7367.

"Host-mediated selection of influenza virus receptor variants. Sialic acid-alpha 2,6Gal-specific clones of A/duck/Ukraine/1/63 revert to sialic acid-alpha 2,3Gal-specific wild type in ovo".

- Rogers, G. N., Paulson, J. C., *Virology*, **1983**, 127(2), 361-373.
"Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin".
- Romeis, B., **1989**, 17. Auflage.
"Mikroskopische Technik".
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W. J., *Science*, **1992**, 256(5057), 673-675.
"Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*".
- Roy, R., Pon, R., *Glycoconjugate Journal*, **1990**, 7, 3-12.
"Efficient synthesis of $\alpha(2-8)$ -linked *N*-acetyl and *N*-glycolylneuraminic acid disaccharides from colominic acid".
- Rück-Braun, K., *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, **1998**, 46(4), 432-436.
"Selectin-Inhibitoren".
- Sato, C., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1998**, 273, 2575-2582.
"Identification of oligo-*N*-glycolylneuraminic acid residues in mammal-derived glycoproteins by a newly developed immunochemical reagent and biochemical methods".
- Schachter, H., **1992**, 263-332.
"Glycoconjugates-Composition, Structure, and Function."
- Schauer, R., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **1970a**, 351(6), 749-758.
"Biosynthesis of *N*-acetyl-*O*-acetylneuraminic acids. II. Substrate and intracellular localization of bovine acetyl- coenzyme A: *N*-acetylneuraminate-7- and 8-*O*-acetyltransferase".
- Schauer, R., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **1970b**, 351(5), 595-602.
"Biosynthesis of *N*-acetyl-*O*-acetylneuraminic acids. I. Incorporation of [14-C]acetate into sections of the submaxillary salivary gland of ox and horse".
- Schauer, R., *Fifth International Symposium on Glycoconjugates, Kiel*, **1979**.
- Schauer, R., in: *Sialic Acids - Chemistry, Metabolism and Function*, R.Schauer (ed.), Springer Verlag, Wien, **1982**.
- Schauer, R., Casals-Stenzel, J., Corfield, A. P., Veh, R. W., *Glycoconjugate Journal*, **1988b**, 5, 257-270.
"Subcellular Site of the Biosynthesis of *O*-Acetylated Sialic Acids in Bovine Submandibular Gland".
- Schauer, R., De Freese, A., Gollub, M., Iwersen, M., Kelm, S., Reuter, G., Schlenzka, W., Vandamme-Feldhaus, V., Shaw, L., *Indian J Biochem Biophys*, **1997**, 34, 131-141.
"Functional and biosynthetic aspects of sialic acid diversity".
- Schauer, R., Kamerling, J. P., in: *Glycoproteins II*, Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H (eds.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402.
"Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids".
- Schauer, R., Reuter, G., Stoll, S., *Biochimie*, **1988a**, 70(11), 1511-1519.
"Sialate *O*-acetylerases: key enzymes in sialic acid catabolism".
- Schauer, R., Reuter, G., Stoll, S., Shukla, A. K., *J Biochem (Tokyo)*, **1989**, 106(1), 143-150.
"Partial purification and characterization of sialate *O*- acetylerase from bovine brain".
- Schauer, R., Schmid, H., Pommerencke, J., Iwersen, M., Kohla, G., **2000**.
"Metabolism and role of *O*-acetylated sialic acids".
- Sekine, M., Ariga, T., Miyatake, T., Kase, R., Suzuki, A., Yamakawa, T., *J Biochem (Tokyo)*, **1984**, 96(1), 237-244.
"Gangliosides and neutral glycolipids in guinea pig adrenal glands".

- Seksek, O., Biwersi, J., Verkman, A. S., *J Biol Chem*, **1995**, 270(10), 4967-4970.
"Direct measurement of trans-Golgi pH in living cells and regulation by second messengers".
- Senn, H. J., Orth, M., Fitzke, E., Wieland, H., Gerok, W., *Eur J Biochem*, **1989**, 181(3), 657-662.
"Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins".
- Shi, W. X., Chammas, R., Varki, N. M., Powell, L., Varki, A., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 31526-31532.
"Sialic acid 9-*O*-acetylation on murine erythroleukemia cells affects complement activation, binding to I-type lectins, and tissue homing".
- Shukla, A. K., Schröder, C., Nöhle, U., Schauer, R., *Carbohydr Res*, **1987**, 168(2), 199-209.
"Natural occurrence and preparation of *O*-acylated 2,3-unsaturated sialic acids".
- Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A., Zopf, D., *Infection and Immunity*, **1997**, 65(2), 750-757.
"Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides".
- Sjöberg, E. R., Powell, L. D., Klein, A., Varki, A., *J Cell Biol*, **1994**, 126(2), 549-562.
"Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-*O*-acetylation of sialic acids".
- Skipiski, V. P., *Methods Enzymol*, **1975**, 35, 396-425.
"Thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids".
- Slomiany, A., Slomiany, B. L., *J Biol Chem*, **1978**, 253(20), 7301-7306.
"Structures of the acidic oligosaccharides isolated from rat sublingual glycoprotein".
- Smith, B. J., Lawrence, M. C., Barbosa, J. A. R. G., *J Org Chem*, **1999**, 64, 945-949.
"Substrate-assisted catalysis in sialic acid aldolase".
- Song, Y., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y., *J Biol Chem*, **1991**, 266(32), 21929-21935.
"Isolation and structural elucidation of a novel type of ganglioside, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipid, from rainbow trout sperm. The first example of the natural occurrence of KDN-ganglioside, (KDN)GM3".
- Song, Y., Kitajima, K., Inoue, S., Muto, Y., Kasama, T., Handa, S., Inoue, Y., *Biochemistry*, **1993**, 32(35), 9221-9229.
"Structure of novel gangliosides, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipids, isolated from rainbow trout ovarian fluid".
- Spiro, M. J., Spiro, R. G., *J Biol Chem*, **1985**, 260(9), 5808-5815.
"Effect of anion-specific inhibitors on the utilization of sugar nucleotides for *N*-linked carbohydrate unit assembly by thyroid endoplasmic reticulum vesicles".
- Stellwagen, E., *Methods Enzymol*, **1990**, 182:343-57, 343-357.
"Chromatography on immobilized reactive dyes".
- Streng, K., Schauer, R., Bovin, N., Hasegawa, A., Ishida, H., Kiso, M., Kelm, S., *Eur J Biochem*, **1998**, 258, 677-685.
"Glycan specificity of myelin-associated glycoprotein and sialoadhesin deduced from interactions with synthetic oligosaccharides".
- Stryer, L., **1994**, 2. korr, Nachdruck der völlig neubearb. Aufl. 1990(21), 516-539.
"Aminosäureabbau und Harnstoffzyklus".
- Suzuki, Y., *TIGGS*, **1990**, 2, 112-115.
"Biological role of *O*-acetylated sialic acid".
- Svennerholm, L., *Journal of Neurochemistry*, **1963**, 10, 613-623.
"Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides".

- Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., Iwanaga, S., Kobata, A., *J Biol Chem*, **1979**, 254(17), 8548-8553.
- "The sugar chains of cold-insoluble globulin. A protein related to fibronectin".
- Tekieva, E. A., Diatlovitskaia, E. V., *Biokhimiia*, **1993**, 58(10), 1641-1644.
- "Ganglioside lactones in human stomach and breast tumors".
- Terabayashi, T., Kawanishi, Y., *Carbohydr Res*, **1998**, 307, 281-290.
- "Naturally occurring ganglioside lactones in Minke whale brain".
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Stockert, R. J., Poralla, T., Gerken, G., *J GEN VIROL*, **1994**, 75 (Pt 11), 3021-3029.
- "The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers".
- Ueno, K., Ando, S., Yu, R. K., *J Lipid Res*, **1978**, 19(7), 863-871.
- "Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin".
- Vandamme-Feldhaus, V., Schauer, R., *J Biochem (Tokyo)*, **1998**, 124(1), 111-121.
- "Characterization of the enzymatic 7-O-acetylation of sialic acids and evidence for enzymatic O-acetyl migration from C-7 to C-9 in bovine submandibular gland".
- Vann, W. F., Tavarez, J. J., Crowley, J., Vimr, E., Silver, R. P., *Glycobiology*, **1997**, 7, 697-701.
- "Purification and characterization of the Escherichia coli K1 neuB gene product N-acetylneuraminic acid synthetase".
- Varki, A., *Glycobiology*, **1992**, 2(1), 25-40.
- "Diversity in the sialic acids [published erratum appears in Glycobiology 1992 Apr;2(2):following 168]".
- Varki, A., *Glycobiology*, **1993**, 3(2), 97-130.
- "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct".
- Varki, A., *FASEB J.*, **1997**, 11, 248-255.
- "Sialic acids as ligands in recognition phenomena".
- Varki, A., Diaz, S., *Anal Biochem*, **1984**, 137(1), 236-247.
- "The release and purification of sialic acids from glycoconjugates: methods to minimize the loss and migration of O-acetyl groups".
- Varki, A., Hooshmand, F., Diaz, S., Varki, N. M., Hedrick, S. M., *Cell*, **1991**, 65(1), 65-74.
- "Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetyl-esterase".
- Veh, R. W., Michalski, J. C., Corfield, A. P., Sander-Wewer, M., Gies, D., Schauer, R., *J Chromatogr*, **1981**, 212(3), 313-322.
- "New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides".
- Vliegthart, J. F., Dorland, L., Van Halbeek, H., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1983**, 41, 209-374.
- "High Resolution H-1 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Tool in the Structural Analysis of Carbohydrates Related to Glycoproteins".
- von Jagow, G., Link, T. A., Schagger, H., **1994**, (1), 3-21.
- "Purification and Strategies for Membrane Proteins".
- Wessels, M. R., DiFabio, J. L., Benedi, V. J., Kasper, D. L., Michon, F., Brisson, J. R., Jelinkova, J., Jennings, H. J., *J Biol Chem*, **1991**, 266(11), 6714-6719.
- "Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B Streptococcus capsular polysaccharide".

Wibawan, I. W., Lammler, C., *J Gen Microbiol*, **1991**, 137 (Pt 12), 2721-2725.

"Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B".

Wu, M. M., Llopis, J., Adams, S., McCaffery, J. M., Kulomaa, M. S., Machen, T. E., Moore, H. P., Tsien, R. Y., *Chem Biol*, **2000**, 7(3), 197-209.

"Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin".

Zimmer, G., Suguri, T., Reuter, G., Yu, R. K., Schauer, R., Herrler, G., *Glycobiology*, **1994**, 4(3), 343-349.

"Modification of sialic acids by 9-*O*-acetylation is detected in human leucocytes using the lectin property of influenza C virus".

7 Danksagung

Die Anzahl der Personen, die mir in irgendeiner Weise beim Anfertigen dieser umfangreichen Arbeit geholfen haben und dabei beratend, tröstend oder ermutigend zur Seite standen, kann nicht klein sein. So hoffe ich im Folgenden inständig, keinen dieser Menschen ungeachtet gelassen zu haben.

Mein großer Dank gilt **Prof. Dr. Roland Schauer**. Schon Anfang der 1970er Jahre entdeckte er die *O*-Azetyltransferasen. Er kann somit als "Vater" dieser Arbeit bezeichnet werden. Stets hat er Nutzen und Wirkung in meinem Streben gesehen und dieses Werk als einen Durchbruch auf dem Weg zur *O*-Azetyltransferaseforschung eingeordnet. Ohne ihn und seine umfangreiche Forschung auf dem Sektor der *O*-Azetyltransferasen wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Als Neuzugang des Instituts für Organische Chemie setzt Frau **Prof. Dr. Thisbe Lindhorst** sich mit Vehemenz für die Zukunft der interdisziplinären Kohlenhydratforschung in Kiel ein. Ihre Bereitschaft zur Übernahme des Hauptreferats für meine Arbeit schätze ich außerordentlich.

Die Technische Assistentin und langjährige Begleiterin meiner Arbeit im Chemielabor, **Hiltrud Dora**, hat mir viele Lasten abgenommen, gerade wenn es um die Aufbereitung von Hirn, Leber und Serum ging. Selbst nach Übernahme eines eigenen Forschungsprojektes war der aufmunternde und fachkompetente Umgang mit ihr in Hinblick auf die eigene Forschung stets eine Stütze und dadurch ein Gewinn.

Auch **Dr. Guido Kohla** war immer für Fragen offen und bewahrte dabei eine übergreifende Ruhe, die auch schon anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ein inneres Gleichgewicht wiedergegeben hat. Von seiner Erfahrung im Umgang mit Gangliosiden habe ich sehr viel lernen und profitieren können.

Obwohl sehr vielbeschäftigt und manches Mal in großer Anspannung, verbarg sich unter den dunklen Augenbrauen **Dr. habil. Lee Shaws** ein erfrischender britischer Humor und ein hohes Interesse an einer auch noch so einfachen fachlichen Fragestellung. So entstand stets eine fruchtbare Diskussion, die mir die Augen für andere Perspektiven öffnete und den kritischen Blick auf vermeintlich trivialen Ergebnissen schärfte.

Und was wäre ein Institut ohne sein Sekretariat, das die Fäden der Organisation fest in der Hand hält und für die Stimmung unter den Mitarbeitern einen wichtigen Beitrag leistet. Auf diesem Wege möchte ich **Frau Schauer** und auch **Antje Krohn** wirklich sehr danken.

Der Chemielaborant **Marzog El Madani** hat für den unermüdlichen Nachschub von freien Sialinsäuren und Sialyllaktosen gesorgt, wofür ihm mein besonderer Dank gilt, ist doch vielen nicht bewußt, wieviel Mühe in der Präparation solcher Sialinsäuren steckt.

Ich danke außerdem der Pharmazeutin **Evelin Tiralongo** für den frischen Wind in unserem Büro, gerade in der Endphase meiner Arbeit.

Ohne die große Kooperationsbereitschaft des Pharmakologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die im Rahmen des pharmakologischen Praktikums für Mediziner benötigten Meerschweinchen waren auch meine Quelle für frische Organe und Blut. In dieser Hinsicht gebührt mein außerordentlicher Dank den Technischen Assistentinnen **Marion Pauer**, **Annika Dorst** und **Micheline Neubert**, die die Tiere fachgerecht töteten. Marion Pauer war dabei stets bereit, mir die Aufgabe der Organentnahme abzunehmen. Ich möchte an dieser Stelle betonen, daß ich bedacht war, keine Tötung eines Meerschweinchens über die vom pharmakologischen Instituts hinaus bereitgestellten Tiere in Kauf zu nehmen.

Dr. med. Friedrich Paulsen aus dem Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität hat sehr hilfsbereit die elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie die dafür notwendigen Präparationen übernommen, mein großer Dank geht auch an seine Adresse.

Die gesamte **O-Azetyltransferasegruppe** hat in Ihrem Bemühen um die Wissenschaft der O-Azetyltransferasen bisher ein unermüdliches Durchhaltevermögen gezeigt. Ihnen gilt mein Dank für die "Mitleidenschaft" und die vielfach ausgesprochenen Durchhalteparolen. In dieser Hinsicht sei die "unheimliche" Ruhe des australischen Post Docs **Dr. Joe Tiralongo** bemerkt, der englische Texte seiner deutschen Mitstreiter genußvoll korrigierte.

Prof. Shinsei Gasa danke ich für die großzügige Überlassung des Neu4Ac5Gc-GM3, das meine Motivation für meine Arbeit wieder gestärkt hat.

Allen anderen, die ich nicht genannt habe, die aber durch ihr entschlossenes Wirken in der Arbeitsgruppe auch mich beeinflußt und zu jeder Zeit eine gute Arbeitsatmosphäre geschaffen haben, danke ich von ganzem Herzen, sind sie doch mit die Basis für ein dynamisches und internationales Miteinanders.

Ein Wort (wenn es denn ausreicht) möchte ich insbesondere den ausländischen Arbeitsgruppenmitgliedern schenken. Ohne sie wären die Jahre an diesem Institut nur halb so schön gewesen. Der Wert, den solch eine internationale Zusammenarbeit nicht nur in fachlicher Hinsicht besitzt, ist keine Momentaufnahme, er wird für mich auch in Zukunft entscheidend sein. Dafür bin ich Euch allen sehr dankbar.