

Metabolische Markierung

A.2

Kursprotokoll – Josef Riedl (Gr. 7) – 11/2003

Sinn des Versuches

Werden einer Zelle radioaktiv (oder chemisch) markierte Substrate gegeben, so kann man mit anschließenden Analysen das Auftreten der Markierung verfolgen und Informationen über den Verbrauch und Einbau des Substrats bzw. der Folgeprodukte gewinnen. Hier wurde ein solches Experiment mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Untersucht wurde dabei das Enzym Carboxypeptidase Y (CPY); als markiertes Substrat diente S-35-Methionin.

Der Versuch gliederte sich in folgende Teilexperimente:

a) Analyse des umgebenden Mediums

Der Met-Gehalt (noch nicht eingebautes, freies Met) wurde zu verschiedenen Zeiten über direkte Szintillationszählung gemessen.

b) Analyse des Zellmaterials

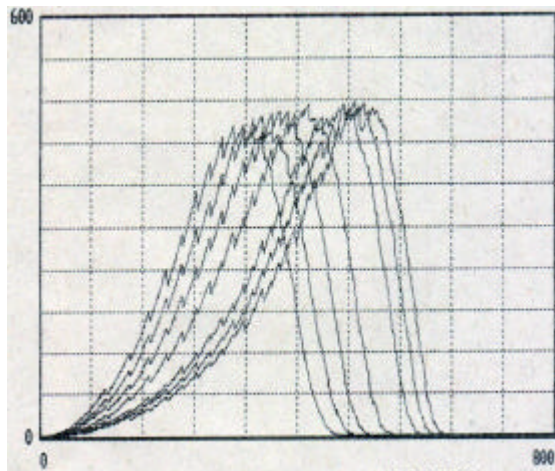
Der hier - ebenfalls zeitabhängig - gemessene Met-Gehalt entspricht dem Methionin, das von der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt bereits aufgenommen wurde.

c) Analyse des Proteinanteils

Hier wurde selektiv nur das Methionin erfasst, das bereits in irgendein Protein eingebaut wurde.

d) Genaue Untersuchung der markierten CPY

Die CPY wurde über verschiedene Schritte mit abschließender Immunpräzipitation isoliert. Eine SDS-PAGE gab dann Aufschluss über die Masse des Proteins. Insbesondere konnte hierbei die korrekte, glycosylierte Endform des Enzyms (61 kD) von unreifen Formen (nicht glycosyliert, 59 kD; nicht modifiziert, 68 kD) unterschieden werden. Dieser Teil wurde auch mit Hefezellen durchgeführt, bei denen die N-Glycosylierung erblich defekt oder durch Tunicamycin behindert ist. Das Bandenmuster der SDS-PAGE konnte für diese Fälle verglichen werden.



Anmerkung: Die in letzterer Untersuchung gewonnenen Ergebnisse ließen sich auch mit Hilfe einer anderen Markierungsmethode oder sogar durch unspezif. Färbung bei der SDS-PAGE gewinnen, da auch im durchgeführten Experiment die Selektivität nicht auf der r.a. Markierung (die sich in der Zelle an viele Orte verteilt, insbesondere alle Proteine sind gleichermaßen markiert), sondern auf der Spezifität des Antikörpers bei der Immunpräzipitation beruht. Hier diente die Radioaktivität also nur als eine einfach einzuschleusende Art der Markierung, die die spätere Detektion durch Autoradiographie ermöglicht. Echte Vorteile würde die Methode dann bieten, wenn nur ein

bestimmtes Protein selektiv markiert würde (und die Reinigung dann entfallen kann), oder wenn durch komplexere Experimente, z.B. pulse chase, die Möglichkeit einer kurzzeitigen Markierung ausgenutzt würde.

Arbeitsschritt

Gewinnung der Zellkulturen

Animpfen einer Hefekultur (Stamm X2180, entspricht WT) mit 100 ml YEPGlc;
Anzucht bei 30°C über Nacht.
Endwert: OD578 = 1-2.

Vorbereitung d. Reaktionsansatzes

Zellmaterial (entspr. 30 OD) wurde 3min abzentrifugiert;
Resuspension des Pellets in 15 ml YNB-Glc,

Bedeutung

Anzucht der benötigten Zellen

Wechsel zu einem Medium ohne AS, damit später nur das bereitgestellte r.a. Met aufgenommen wird.

<p>Weiterinkubation bei 30°: 15 min = REAKTIONANSATZ</p> <p>Vorbereitung der Probenansätze a) jeweils 450 µl Na-Azid + 50 µl Probe b) jeweils 5 ml Na-Azid + 50 µl Probe c) jeweils 5 ml TCA + 50 µl Probe d) jeweils 1.5 ml Na-Azid + versch. Mengen</p> <p>Reaktion und Probenentnahme Start durch Zugabe von S-35-Methionin (100 µl bei 75 µCi; A(sp)=1 kCi/mmol), Schütteln Entnahme von Proben und Zugabe zu den entspr. Probenansätzen bei versch. Zeiten: 0 min a)b)c) je 50 µl 5 min a)b)c) je 50 µl; d) 5 ml 10 min a)b)c) je 50 µl; d) 2.5 ml 20 min a)b)c) je 50 µl 30 min a)b)c) je 50 µl; d) 2.5 ml</p> <p>Probenbehandlung für a) Schütteln (Whirlmix) Zentrifugation (5 min) Verwendung des Überstandes; 100 µl + 5 ml Cocktail; Szintillationsmessung</p> <p>Probenbehandlung für b) Abfiltrieren der Probe am Mehrfach-Gerät durch einen in Phosphatpuffer getränkten Membranfilter, Waschen mit Natriumphosphatpuffer (0.1M, pH 6.5; 3x 3 ml) Verwendung des Filters (Pinzette): Szintillationsmessung (1 min, mit 5 ml Cocktail)</p> <p>Probenbehandlung für c) Abfiltrieren der Probe am Mehrfach-Gerät durch einen in dest. Wasser getränkten Membranfilter, Waschen mit TCA 10% (3 x 3 ml) und MeOH 80% (1 x 3 ml) Verwendung des Filters (Pinzette) Szintillationsmessung (1 min, mit 5 ml Cocktail)</p> <p>Probenbehandlung für d) <u>Entfernen des Mediums</u> sofort nach Entnahme: Zentrifugation (3 min), dann auf Eis am Ende: Zentrifugation (5 min) Absaugen des Überstands (Wasserstrahlp.) Resuspension in 1 ml Na-Azid (20 mM) Zentrifugation in Eppendorfcups (3 min) Absaugen des Überstands</p> <p><u>Zellaufschluß und Protoplastierung</u> Resuspension in 75 µl Protoplastenpuffer (mit</p>	<p>Adaptation</p> <p>Die Proben wurden später zu verschiedenen Zeiten dem Reaktionsansatz entnommen. Na-Azid (20 mM) diente zum Abstoppen aller Zellreaktionen. TCA (10%) fällt zudem Proteine aus (s.u.).</p> <p>Beginn der Aufnahme und Einbau von r.a. Met</p> <p>Für a-c (Szintillationsmessung) genügten sehr kleine Mengen. Bei d) waren für Proteinanalytik (PAGE) und Autoradiographie grössere Mengen erforderlich.</p> <p>Nach der Abzentrifugation aller Zellbestandteile konnte die Radioaktivität im Medium (Überstand) gemessen werden.</p> <p>Es wurden fünf Messwerte erhalten.</p> <p>Isotonischer Puffer gewährleistet den Erhalt der Zellen als Ganzes. Reste des Mediums wurden durch Absaugen und Waschen entfernt. Das ermöglichte die Messung der Radioaktivität im Zellmaterial.</p> <p>Es wurden fünf Messwerte erhalten.</p> <p>Dest. Wasser bringt Zellen durch osmot. Schock zum Platzen. In der Zelle gelöste Substanzen wurden ausgewaschen; Proteine wurden durch TCA denaturiert, aggregierten aus und blieben im Filter hängen. So konnte die Radioaktivität im Protein gemessen werden. Man erhielt fünf Messwerte.</p> <p>Es musste für Telexperiment (d) eine komplette Proteinreinigung durchgeführt werden. Die Reinigung erfolgte zunächst relativ „grob“ und abschließend durch eine hochspezifische Immunreaktion. — Zentrifugieren sorgte dafür, dass der Zellanteil fest am Boden des Gefässes hängenblieb und Reste des Mediums leicht entfernt werden konnten. Natriumazid diente erneut zum Abstoppen aller Reaktionen in der Zelle.</p> <p>Zymolyase spaltet spezifisch die Zellwand von Hefe.</p>
---	---

Zymolyase), Inkubation (RT, 15 min)
 Zentrifugation (1 min), Absaugen;
 Resuspension in 1 ml Protoplastenpuffer (ohne Zymolyase)
 Zentrifugation, vorsichtiges Absaugen

Gewinnung der lösl. Proteinfraktion

Herstellen von wirksamem Lysepuffer:
 700 µl Lysepuffer (enthält Tris-HCl, SDS) + 10 µl Benzamidin 200 mM +
 2 µl PMSF (200 mM);
 Resuspension der Protoplasten in 150 µl Lysepuffer, Mischen, Inkubation (RT, 5 min)

Zugabe von 850 µl TNET-Puffer (enth. Tris, EDTA, Triton)
 Zentrifugation (15', Sorvall 20000 rpm)
 Vorsichtiges Abnehmen des Überstandes (*)

Indirekte Immunpräzipitation

Zugabe von 2 µl Antikörper anti-CPY
 Inkubation (4°C, über Nacht)
 Pro Probe: Einwiegen von 5 mg ProteinA-Sepharose + 1 ml TNET-Puffer
 Quellen (30', 4°C)
 Zentrifugieren, Waschen mit TNET-Puffer (2 x 1 ml, jeweils 2 min abzentrifugieren und absaugen)

Weiterverarbeitung von (*):
 Zentrifugation (30', Sorvall 20000 rpm)
 Überführen des Überstandes in die vorbereiteten Ansätze (ProtA-Sepharose)
 Rollern (4°C, 60 min)

Zentrifugation (2 min)
 Waschen des Pellets mit TNET-Puffer (4 x 1 ml) und Tris-Saline (1 x 1 ml), dazwischen Whirlmix, 2 min Zentrifugation, Absaugen

Ablösen der CPY

Zugabe von 30 µl SDS-Probenpuffer
 Mischen
 Inkubation (95°C, 5 min)
 Zentrifugation (5 min)
 Abnehmen des Überstandes

SDS-PAGE und Sichtbarmachung

Auftragen auf PAGE (8% Trenngel)
 zusätzlich Proteinstandard
 Elektrophorese
 Fixieren mit Coomassie Blue (1h)
 Entfärben (über Nacht)

20 min Inkubation in Amplify
 Trocken (im Geltdrockner auf Whatman-M3)

Der Puffer stellte sicher, dass die zellwandfreien Zellen nicht platzten (siehe oben).
 Im zweiten Schritt wurde die Zymolyase (Verunreinigung) wieder entfernt. Es lag nun eine Protoplastensuspension ohne Zellwandbestandteile vor.

Der Lysepuffer ließ nun die Zellen platzen. Das gesuchte Protein befindet sich in der Vakuole; eine organellspezifische Vortrennung ist daher (bis auf das Entfernen der Wand) schwierig. Man erhält hier die gesamten Zellproteine.

Nur ein Teil der Proteine war unter den geg. Bedingungen löslich. Mit dem Überstand wurde hier die lösl. Fraktion weiterverwendet, die auch die CPY enthielt.

Die Immunreaktion erlaubte die spezif. Isolierung der CPY aus der Masse der löslichen Proteine.
 Der nun gebildete Antikörper-CPY-Komplex ist selbst löslich und deshalb schwer zu isolieren. Protein A bindet jedoch wiederum (unspezif.) Antikörper und liegt selbst an Sepharose-Moleküle gekoppelt vor;

bei der Zugabe des CPY-haltigen Überstandes (*) bildete sich also ein Gesamtkomplex aus ProtA-Sepharose und Antikörpern mit CPY;

dieser konnte durch Zentrifugation leicht gewonnen werden. Reste von Sepharose, anderen - löslichen - Substanzen usw. werden abgewaschen.

Der Gesamtkomplex wurde nun durch SDS wieder aufgebrochen, die CPY wurde abgelöst und lag dann wieder frei vor. Das war Voraussetzung für die anschließende Proteinanalytik.

SDS-PAGE trennt Proteine nach Molekulargewicht auf. Es war also später möglich, wie eingangs erklärt, Masse und Glycosylierungszustand der CPY zu ermitteln. Coomassier Blue färbt Proteine blau an, was zur Sichtbarmachung des Standards erforderlich war.

Zur Sichtbarmachung der CPY konnte aufgrund der r.a. Markierung eine Autoradiographie neben der

Auflegen auf Röntgenfilm
Exponieren (1-2 Tage)

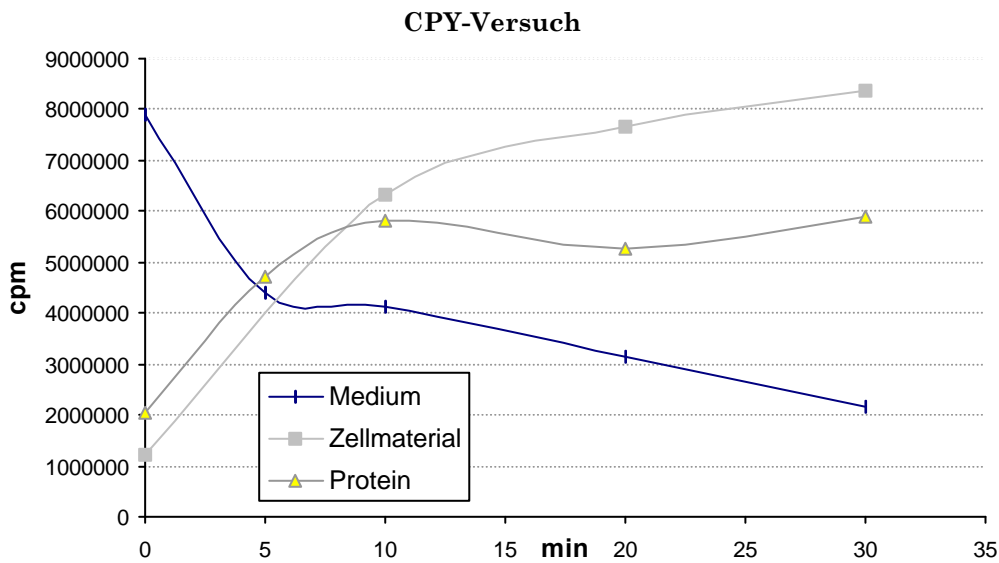
üblichen Anfärbung verwendet werden.

Auswertung der Aufnahme- und Einbau-Kinetik

Die aus den Probenreihen a), b), c) erhaltenen Meßwerte sind in der Tabelle aufgelistet. Die „normierten Werte“ ergaben sich aus der Umrechnung auf 1 ml Markierungsmedium. So wurden vergleichbare Meßreihen erhalten. Die absoluten Werte (cpm) sollten hier nicht weiter ausgewertet werden, Ziel war vor allem ein qualitativer Überblick über die Kinetik der Aufnahme in die Zelle bzw. des Einbaus in die Proteinfraktion.

CPY-Versuch (Meßwerte)				CPY-Versuch (Normierte Werte)			
Zeit / min	cpm Medium	cpm Zellmaterial	cpm Protein	Zeit / min	cpm Medium	cpm Zellmaterial	cpm Protein
0	79126	60310	102380	0	7912600	1206200	2047600
5	43976	88753	235770	5	4397600	(1775060)	4715400
10	41320	316480	290610	10	4132000	6329600	5812200
20	31388	382420	263110	20	3138800	7648400	5262200
30	21760	418480	294450	30	2176000	8369600	5889000

Die Werte wurden nun in einem gemeinsamen Diagramm gegen die Zeit aufgetragen:



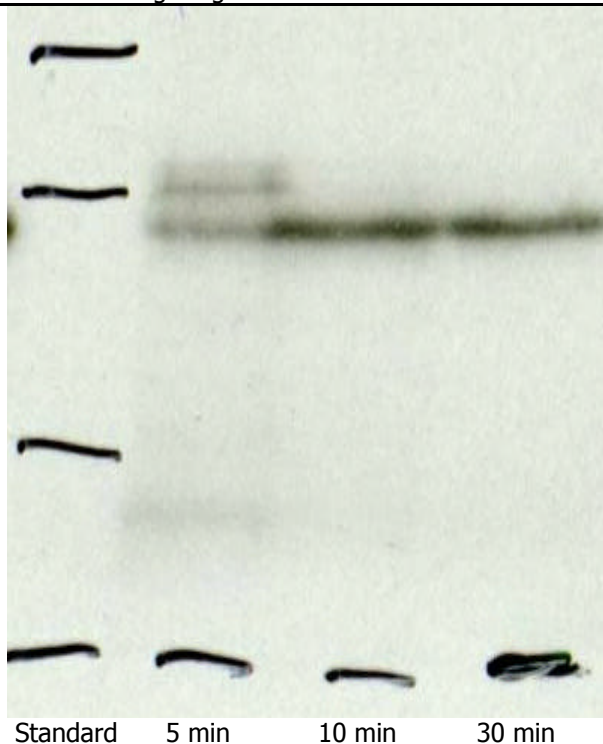
Deutlich ist zu sehen, daß die Radioaktivität (entsprechend der Met-Konzentration) im Medium in dem Maß abnimmt, da Met in die Zelle aufgenommen wird. Die Menge im Proteinmaterial folgt im Verlauf der Menge in der Zelle, bleibt jedoch darunter. Die Differenz der beiden letzteren Kurven entspricht dem Methionin, das frei in der Zelle vorliegt und noch nicht in Proteine eingebaut wurde.

Anmerkung: Die Kurve der Radioaktivität im Proteinmaterial verläuft schwankend. Ob das an Meß- oder Pipettierfehlern liegt, kann nicht unmittelbar entschieden werden. Es ist nämlich zu beachten, daß die Proben, auf denen die Meßwerte basieren, zwar alle aus dem gleichen Reaktionsansatz entnommen wurden, die letztlichen Messungen aber für jeden Meßpunkt mit einem anderen Probenansatz durchgeführt werden mußten. Diese müssten, um eine korrekte Auswertung zu erhalten, völlig identisch behandelt werden. Hier könnte es zu minimalen Unterschieden - beispielsweise zu einem unvollständigen oder verfrühten Abstoppen der enzymatischen Reaktion – zwischen den einzelnen Ansätzen gekommen sein.

Auch die Annahme, daß die drei Verfahren für Medium-, Zellmaterial- und Proteinisolierung (jeweils vor der Messung) vergleichbar quantitative Ausbeuten liefern, ist möglicherweise nicht realistisch. Damit ließen sich evtl. zweifelhafte Ergebnisse (wie die Tatsache, daß die Proteineinbau-Kurve teilweise über der Zellmaterial-Kurve liegt) erklären.

Auswertung der SDS-PAGE (Zeitlicher Ablauf der Glycosylierung)

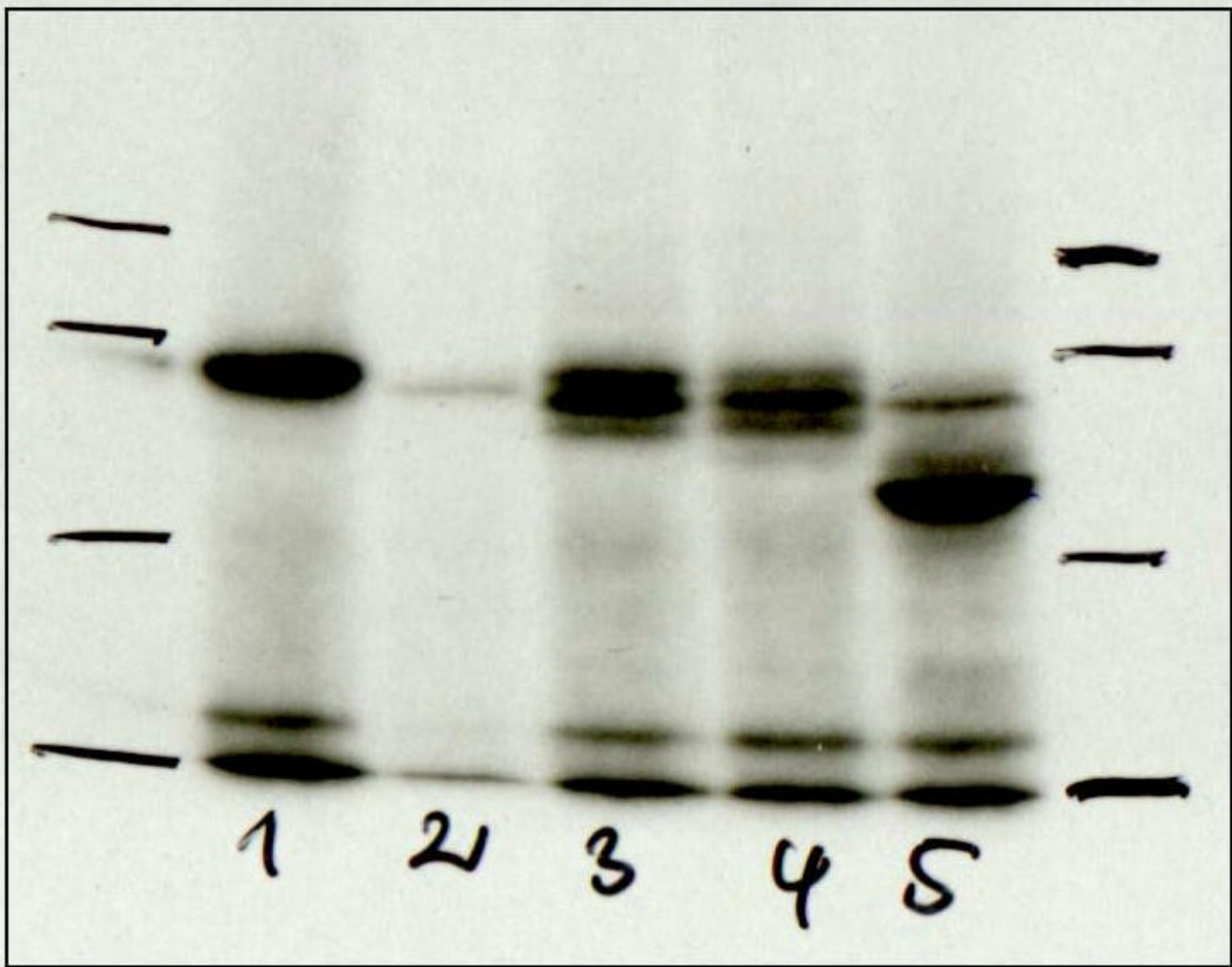
In diesem Telexperiment war das Endziel die genaue Massenbestimmung des gereinigten Proteins durch SDS-PAGE (im Vergleich mit Protein-Standard) und die Interpretation des Ergebnisses v.a. in Bezug auf den Glycosylierungszustand des Proteins. Diese Bestimmung wurde mit den drei Probenansätzen (mit versch. Inkubationszeiten) durchgeführt. Daher sind Rückschlüsse auf den zeitlichen Ablauf der Glycosylierung und Proteinreifung möglich.



Darstellung der SDS-PAGE mit den zu verschiedenen Zeiten aus der WT-Zelle entnommenen Stadien des Proteins. Die Standard-Banden bezeichnen von unten nach oben Start, 45, 66, ?? kD.
 Folgende Schlüsse können gezogen werden:
 1) Die Reinigung war erfolgreich; es wird analytisch nur die CPY nachgewiesen (z.T. mehrere Banden.)
 2) 5 Minuten nach Beginn der Markierung lag das Protein in verschiedenen Stadien vor. Es wurden Banden bei ca. 60 kD, 67 kD, 69 kD nachgewiesen. Zwei Banden entsprechen den unreifen Formen (mit langen KH-Ketten, lokalisiert in ER und Golgi-App.) mit 67 und 69 kD. Ein Teil der CPY hatte aber bereits den Reifungsprozeß durchlaufen und trat in der murenen Form mit 61 kD (nach Modifikation verkürzte KH-Ketten) auf.
 3) Bereits nach 10 min lagen alle markierten CPY-Moleküle in der reifen 61 kD-Form vor.
 4) Es konnten zu diesem Zeitpunkt keine unreifen Formen in ER und Golgi-App. nachgewiesen werden. Entweder kam die CPY-Synthese kurz nach der Markierung zum Erliegen oder in die kurz nach der Markierung neu begonnenen CPY-Moleküle wurde bereits kein r.a. Met mehr eingebaut.

Auswertung der SDS-PAGE (Störungen der Glycosylierung)

Es wurden insgesamt fünf Situationen untersucht: Wildtyp (normale, ungestörte Situation), drei verschiedene Mutanten (genetische Defekte in der N-Glycosylierungs-Maschinerie) und Wildtypzelle, die mit dem N-Glycosylierungshemmstoff Tunicamycin behandelt worden waren. Dabei wurden die Proben jeweils wie die Wildtyp-Zellen (oben: Probenreihe d) behandelt. Anhand der Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-PAGE nach 30 min Inkubation und anschließender Proteinreinigung konnten die Folgen der jeweiligen Störung bezüglich der Anzahl und Länge der Kohlenhydrat-Ketten betrachtet werden.



Darstellung der SDS-PAGE von Proben aus mutierten und Tunicamycin-behandelten Stämmen. Erklärungen zu den einzelnen Spuren (Standard wie oben):

- 1) Wildtyp - Nach der Inkubationszeit von 30 min war die Reifung bereits abgeschlossen und es wurde nur die reife 61 kD-Form nachgewiesen.
- 2) $\Delta mnn1$ (Mutante bezüglich der Modifikation im Golgi-App.) - Es lag fast ausschließlich eine Form der CPY vor, und zwar diejenige mit 4 KH-Ketten. Der Kettenaufbau im ER war korrekt. Die Modifikation im Golgi-Apparat war jedoch unterblieben, die Ketten haben nicht ihre endgültige Länge (Bande etwas unter der normalen Bande für 4 KH-Ketten, vgl. dazu auch 3).
- 3) $\Delta alg5$ (Mutante bezüglich des Aufbaus von KH-Ketten) - Es wurden verschiedene Formen der CPY nachgewiesen, die ihrem Molekulargewicht nach dem Protein mit 4, 3 oder 2 KH-Ketten entsprechen. Es trat hier, stärker als beim WT, auch die Form mit 2 Ketten auf; man kann also von einer Unterglycosylierung sprechen.
- 4) $\Delta ost3\Delta ost6$ (Mutante in nichtessentiellen Proteinen des Glycosylierungs-Komplexes) - Die Reifung des Proteins verläuft im Prinzip normal, aber langsamer. Der Effekt ist offenbar ebenfalls eine gewisse Unterglycosylierung.
- 5) Wildtyp, behandelt mit Tunicamycin* (Hemmstoff für 1. Schritt der Glycosylierung) - Es konnte keine nennenswerte Glycosylierung stattfinden; dem Protein fehlen die 8 kD, die den 4 KH-Ketten entsprechen. Davon unabhängig wurden aber weiterhin im Verlauf der Reifung korrekterweise zwei Peptide von insgesamt 111 AS abgespalten, was zu einer weiteren Reduzierung des Molekulargewichts führte (ca. 50 kD).
- 6) Die Bande nahe der Startlinie trat in einigen Fällen auch bei der anderen SDS-PAGE gleichmäßig auf, konnte aber nicht identifiziert werden. Es könnte sich um ein beliebiges anderes Protein handeln, das z.B. durch Kreuzreaktion mit dem Antikörper fälschlicherweise mit isoliert wurde.

*) Zugabe von insgesamt 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin 10 Minuten vor Zugabe des r.a. Met.