

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Kultivierung der Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*

112 ml LS-Nährlösung in 300 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 38 ml Zellsuspension (meist aus einer 9 d-oder 10 d-Kultur) gemischt und im Dauerlicht (ca. $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei 23-24°C auf Rundschüttlern (120 U/min) kultiviert.

Nährmedien

Für die Kultivierung und Stammhaltung von *Eschscholzia californica* wurde folgendes Nährmedium (Tab.1.) nach Linsmaier/Skoog in modifizierter Form verwendet. Die hergestellte Nährlösungen wurden in 300 ml-Erlenmeyerkolben je 112.5 ml eingefüllt.

Die Kolben wurden mit Aluminiumfolie verschlossen und bei 121°C 20 min autoklaviert.

NH ₄ NO ₃	20.6 mmol/l
KNO ₃	18.8 mmol/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	3 mmol/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,25 mmol/l
H ₃ BO ₃	100 $\mu\text{mol/l}$
MnSO ₄ *H ₂ O	100 $\mu\text{mol/l}$
ZnSO ₄ *7H ₂ O	30 $\mu\text{mol/l}$
KJ	5 $\mu\text{mol/l}$
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1 $\mu\text{mol/l}$
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.1 $\mu\text{mol/l}$
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,15 $\mu\text{mol/l}$
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0.2 mmol/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.1 mmol/l
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	1.2 $\mu\text{mol/l}$
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1.2 $\mu\text{mol/l}$
Naphthylessigsäure	1 $\mu\text{mol/l}$
myo-Inosit	0.55 mmol/l
Saccharose	87.6 mmol/l
Ad 1 Liter dest.Wasser pH 6.0 mit 1 N KOH einstellen (osmotischer Druck 176 mOsm/kg)	

Tab. 1. Zusammensetzung des Nährmediums für die Suspensionskultur von *Eschscholzia californica*

2.2. Präparation von Plasmamembranvesikeln

2.2.1. Ernte von Zellsuspensionen

300 ml Zellsuspensionen (2 Kolben, a 150 ml) wurde rasch durch ein Papierfilter gesaugt (Wasserstrahl-Vakuum), zweimal auf dem Filter mit Wasser gewaschen, die Zellen in eine Aluminiumfolie gewickelt und sofort im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Zellpellets wurden in einer Kühltruhe bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2. Präparation des mikrosomalen Pellets (MP)

Eingefrorene Zellen wurden mit Trockeneis in einer Zelmühle (ZM 1000, Firma Retsch) bei 15000 U/min aufgeschlossen. Nach dem Abdampfen des Trockeneises wurden die fein zermahlene Zellen (60-120 g FM) in 120 ml Homogenisationspuffer von 4°C aufgenommen und mit einem Glashomogenisator bei 4°C weiter homogenisiert. Anschließend wurde das Rohhomogenat bei 1000 x g 15 min zentrifugiert (Zentrifuge K23 D) und der Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 13000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 9500 U/min, 12 min) unterworfen. Der Überstand wurde erneut bei 50000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 30000 U/min, 1 h) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet (MP bzw. mikrosomale Fraktion) wurde mit 2 ml Suspensionspuffer gewaschen, in 9 ml resuspendiert und wurde weiter in Zweiphasensystem bzw. im Saccharosegradienten fraktioniert.

2.2.3. Plasmamembranreinigung durch die Verteilung im wässrigen Zweiphasensystem

Die Vesikelsuspension des mikrosomalen Pellets (s.o.) wurde auf das vorbereitete Zweiphasensystem gegeben (9 ml Vesikelsuspension auf ein 36 g-System, s. Tab.2) und geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 500 x g 10 min, um die Phasen-Trennung in Ober-(OP¹) und Unterphase (UP¹) zu beschleunigen. Es werden mindestens 2 Systeme benötigt (in 2 Zentrifugationsgläsern) von denen zunächst nur eine mit Vesikeln beschichtet wird. Die erste Oberphase (OP¹) mit Vesikeln wurde nun auf die frische Unterphase (UP²) mit Puffer, zur Unterphase (UP¹) wurde frische Oberphase (OP²) gegeben, geschüttelt und einer erneuten Zentrifugation bei 500 x g unterworfen. Anschließend wurden die Oberphasen OP¹ und OP² vereinigt (s.Abb.3).

Nach der Verdünnung der Oberphasen mit Suspensionspuffer im Verhältnis 1:2 erfolgte eine Zentrifugation bei 100000 x g (Beckmann Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70, 35000 U/min, 1 h). Das gewonnene Pellet sollte aus Plasmamembranvesikeln bestehen. Es wur-

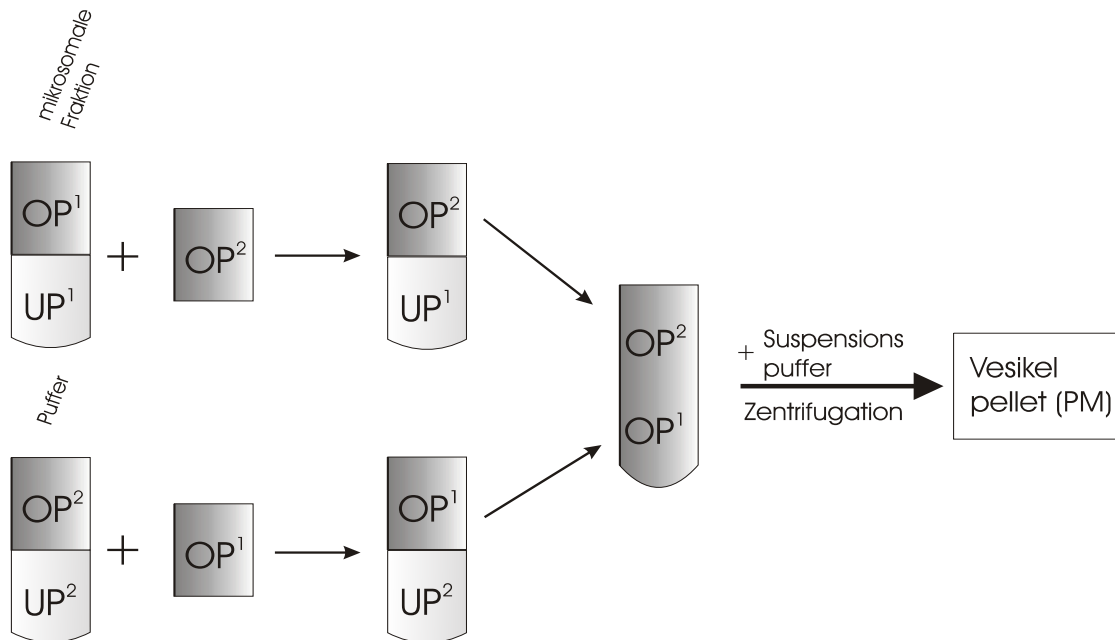


Abb.2. Schema der Reinigung von Plasmamembranvesikeln über Zweiphasensystem

de im entsprechenden Meßpuffer resuspendiert, in dem Markerenzymaktivitäten bzw. Phospholipase-Aktivitäten bestimmt wurden.

2.2.4. Pufferlösungen für die Präparation der Plasmamembranvesikel

Homogenisationspuffer:

- 330 mM Saccharose
- 50 mM MOPS-KOH pH 7.5
- 5 mM EDTA, 5 mM DTE (frisch zusetzen)
- 5 mM Ascorbinsäure (frisch zusetzen)
- 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Stammlösung 100 mM in Isopropanol)
- 0.6% PVP wasserunlöslich (Polyclar AT)
- 0.2% RSA, 2% Cholin

Suspensionspuffer

- 5 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7.8
- 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTE
- 330 mM Saccharose

Herstellung der Zwei-Phasen-Systeme zur Isolation von Plasmamembranvesikeln

Aufgrund der hohen Viskosität der Polymerlösungen lassen sich kaum volumetrisch exakte Maßangaben machen, deshalb erfolgten alle Konzentrationsangaben in Gewichtseinheiten. Die Lösungen wurden mit H₂O dest. Auf das berechnete Gewicht aufgefüllt.

	36 g-System		24 g-System		Endkonz. (w/w)
	Betain	Saccharose	Betain	Saccharose	
Dextran T-500 20 %	11.7 g	11.7 g	7.8 g	7.8 g	6.5%
PEG 3350 40%	5.85 g	5.85 g	3.9 g	3.9 g	6.5%
Saccharose		3.05 g		2.03 g	330 mM
Betain	1.2 g		0.8 g		330 mM
200 mM PO ₄ -Puffer pH-7.8	0.675 ml	0.675 ml	0.45 ml	0.45 ml	5 mM
200 mM KCl	0.675 ml	0.675 ml	0.45 ml	0.45 ml	5 mM
10 mM Na ₂ -EDTA	0.27 ml	0.27 ml	0.18 ml	0.18 ml	0.1 mM
DTE 100 mM	0.27 ml	0.27 ml	0.18 ml	0.18 ml	1 mM
H ₂ O			4.2 g	2.97 g	
End	27 g	27 g	18 g	18 g	
Probe oder Suspensionspuffer	9 g	9 g	6 g	6 g	

Tab. 2. Die Zusammensetzung der Zweiphasensysteme am Beispiel von 6.5 %-iges 36 g bzw. 24 g System

2.2.5. Saccharosegradientenzentrifugation

Die benötigten Saccharoselösungen wurden mit Suspensionspuffer hergestellt.

Der Saccharosegradient bestand aus Schichten mit folgenden Konzentrationen:

25 %, 30 %, 34 %, 38 % 45 % (w/w)

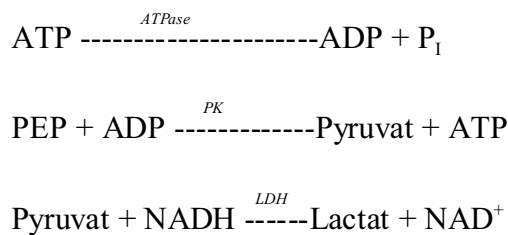
Das Beschichten der Gradienten erfolgte manuell kurz vor der Zugabe der mikrosomalen Fraktion. Nach der Zugabe der mikrosomalen Fraktion (3 ml Vesikelsuspension auf 15 ml Gradient) erfolgte eine Zentrifugation (1h, mit *sw-41* oder *sw-28* Rotor bei 21500 U/min). Nach der Zentrifugation wurden die Banden abgenommen, mit Suspensionspuffer verdünnt und mit einem *Ti-70* Rotor bei 30000 U/min, 30 min zentrifugiert. Alle Zentrifugations- und Verteilungsschritte erfolgten bei 4°C, das Resuspendieren und Homogenisieren der Vesikel im Eisbad.

2.3. Markerenzyme für die Charakterisierung von Plasmamembranen

2.3.1. Bestimmung von ATPase-Aktivitäten

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte nach Palmgren (1990). Die ATP-Spaltung wurde über eine enzymatische Kopplung von Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) anhand des Abfalls der NADH-Konzentration (OD bei 340 nm), in einem Spektrometer Ultraspec 3000 (Pharmacia) bestimmt. Die Initialgeschwindigkeit diente als Maß für die ATPase Aktivität.

Messprinzip:



Messansatz:

-1 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 140 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mg/ml RSA, 1 mM DTE, 0.25 mM NADH, 1 mM PEP, Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Probe und Puffer (10 mM MOPS-BTP pH 7, 330 mM Saccharose)

2.3.2. Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität

Die Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidaseaktivität erfolgte nach Cooperstein (1950). Die Abnahme der Extinktion von Cytochrom c (bei 550 nm) innerhalb einer Minute diente als Maß für die Enzymaktivität.

Messansatz:

-10 µl 1 mM Cytochrom c
-5 µl Membranprotein (ca. 10 µg)
-85 µl Puffer (50 mM Tris-acetat pH 7.4)

2.3.3. Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reductaseaktivität

Die Bestimmung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität erfolgte mit folgendem Messansatz:

10 µl 2 mM NADPH, 2 µl 50 mM KCN, 10 µl 1 mM Cytochrom c (oxidiert), 5 µl Membranprotein (ca. 10 µg) und 73 µl Puffer 50 mM Tris-acetat pH-7.0

Es wurde die Extinktionszunahme von Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt. Die Extinktionsdifferenz pro Minute diente als Maß für die Enzymaktivität.

2.4. Fluorometrische Bestimmung der PLA₂-Aktivität

Die Bestimmung des Fluoreszenz-Anstieges bei der Inkubation einer Vesikelsuspension mit dem fluorogenen Substrat bis-BODIPY-FL-C₁₁-Phosphatidylcholin (BPC) erfolgte kontinuierlich unter Rühren am Fluorometer. Die Anstieg der Fluoreszenz wurde kontinuierlich verfolgt. Die Messungen wurden in einem Fluormeter Shimadzu RF-5000 (Excitationswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 515 nm).

Messansatz:	Stammlösung
-10 µl Vesikel	1.2-1.5 mg/ml
-1-10 µl BPC	10 µM-100 µM verdünnt aus 1 mM (DMSO)
	Stammlösung mit Suspensionspuffer
-89-80 µl Puffer	Suspensionspuffer

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 1-2 Minuten verfolgt.

Der Anstieg der Geraden aus der Fluoreszenzzunahme pro Zeit wurde berechnet und kann unter definierten Umständen als Maß der Enzymaktivität angesehen werden.

2.5. Analytische und quantitative Dünnschichtchromatographie

Die Umsetzung der Phospholipide wurde an Hand ihrer Hydrolyseprodukte nach HPTLC-Trennung verfolgt. Die Proben wurden mit Hilfe eines AS 30 TLC-Applikators (Desaga, Deutschland) auf HPTLC-Platten (Kieselgel-60, 10 x 10 cm, bzw 5 x 5 cm Merck, Deutschland) aufgetragen. Auf den 10 x 10 cm-Platten wurden pro Seite 20-bis 22 Proben, auf 5 x 5 einseitig 10 Proben mit einem Länge von 2 mm und mit 4 mm Abstand aufgetragen. Nach dem Auftragen der letzten Probe wurden die Platten luftgetrocknet. Die Trennung der Proben auf der 10 x 10 cm-Platten erfolgte in einer Horizontalkammer (Camag, Schweiz) in der Sandwichkonfiguration, 5 x 5 cm-Platten in einer Horizontalkammer (Merck, Deutschland) mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65+25+4. Dabei betrug die Laufstrecke 43 mm für die Proben. Anschließend wurden die Platten unter dem Abzug getrocknet.

2.5.1. Herstellung von fluoreszenzmarkierten Phospholipase-digests

Alle imfolgenden beschriebenen Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert und daraus die Phospholipide, wie in 2.5.2. beschrieben, extrahiert. Die unteren Chloroformphasen wurden entnommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 96%-igem Ethanol aufgenommen und anschließend zur Analyse verwendet.

Produkte von PLA₂ (Lyso-PC plus Fettsäure)

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH 6.5
- 20 µl CaCl₂ (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLA₂ (SL 1u/µl) aus *Apis mellifera* (Sigma P 9279)

Produkte von PLC (fluoresz. DAG)

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH 6.5
- 20 µl CaCl₂ (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLC (SL 0.25u/µl) aus *C. perfringens* (Sigma P 7633)

Produkte von PLD (fluoresz. PA)

- 150 µl 50 mM MOPS-KOH pH-6.5
- 20 µl CaCl₂ (SL 100 mM)
- 20 µl BPC/ BEPC (SL 1 mM)
- 10 µl PLD (SL 0.5 u/µl) aus Weißkohl (Sigma P 7758)

2.5.2. Extraktion der Phospholipide für die HPTLC

Die Phospholipidextraktion erfolgte modifiziert nach Bligh & Dyer (1959). Dazu wurden die Proben mit dem dreifachen Probenvolumen Methanol:Chloroform (2:1 v/v) versetzt und gründlich geschüttelt (Vortex). Etwa nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu den Proben das gleiche Volumen reines Chloroform und das gleiche Volumen 150 mM NaCl-Lösung zugegeben. Um eine schärfere Phasentrennung herbeizuführen, wurden die Proben dann in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Nach der Phasentrennung wurden die Proben von der unteren Chloroformphase vorsichtig entnommen und zur Dünnschichtchromatographie verwendet.

2.5.3. Detektion fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC

Die Platten, auf denen fluorogene Phospholipide aufgetragen waren, wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers Storm 860 (Molecular Dynamics, USA) im Modus Chemoblue-Fluoreszenz bei einer Spannung von 950 V gescannt und die Fluoreszenzintensität der Banden mit der Image Quant-Software quantifiziert.

2.5.4. Quantifizierung fluoreszierender Phospholipide in der HPTLC

Die maschinelle Probenauftragung auf die Dünnschichtplatte ermöglicht es eine quantitative Auswertung der Chromatogramme durchzuführen. Aus 1 mM BEPC und BPC Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von 5-100 nM in Ethanol hergestellt. Von den Verdünnungsreihen wurde je 2 µl Probe auf dem Chromatogramm mit Hilfe eines Applikators (s. Kap.2.5.) aufgetragen. Nach der Auftrennung in der Chromatographie wurde die Fluoreszenz der Proben aus der Verdünnungsreihe mit Hilfe des o.g. Phospho-Imagers gemessen, indem die fluoreszierenden Flächeneinheiten der Phospholipide quantifiziert wurden. BEPC wurde als Standard für alle Metabolite, die 1 fluoreszierende Fettsäure tragen, verwendet, die Verdünnungsreihe von BPC diente als Standard für alle Metabolite mit zwei fluoreszierenden Fettsäuren. Aus der graphischen Auftragung der Fluoreszenzeinheiten gegen die Mengen auf der DC-Platte wurden folgende Anstiege ermittelt: $K_{BPC}=308.6$, $1/K_{BPC}=0.003241$ und $K_{BEPC}=121.7$, $1/K_{BEPC}=0.008218$ bei PMT 950 V (s.Abb. 3.b.) sowie $K_{BPC}=71.96$, $1/K_{BPC}=0.0139$ und $K_{BEPC}=29.42$, $1/K_{BEPC}=0.03399$ bei PMT 800 V (s.Abb.3.a). Die starke Abhängigkeit der Anstiege von der verwendeten PMT-Spannung macht es notwendig, die Versuche bei konstanten Geräteparameter durchzuführen. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenz von BEPC und BPC ausschließlich bei einer PMT von 950 V gemessen. Zur Bestimmung der jeweiligen Substanzmenge wurde gemessene Fluoreszenzwert mit dem zugehörigen 1/K-Wert (K =Anstieg der Kalibrier-Kurve) multipliziert.

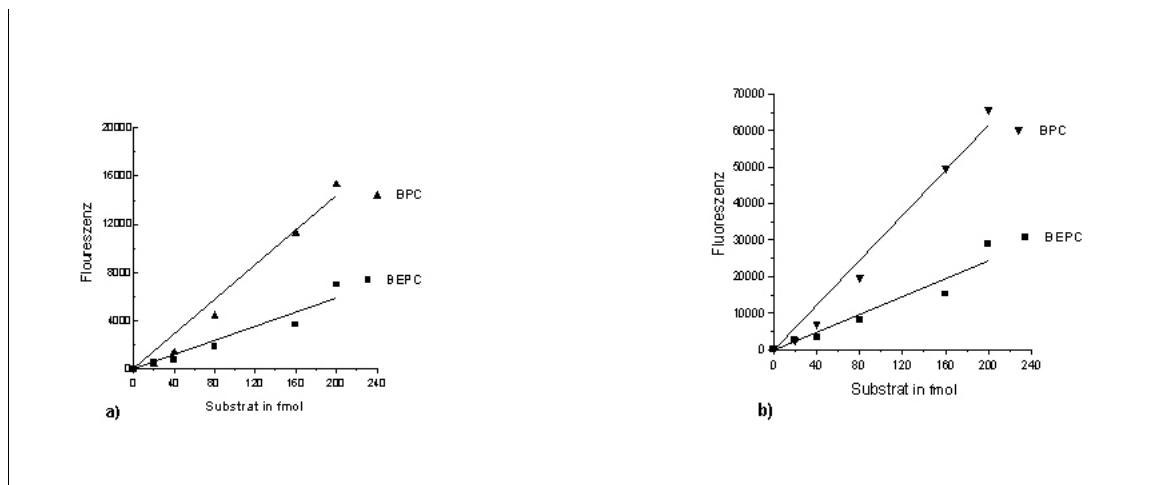


Abb.3. Eichkurve zur Quantifizierung der fluorogenen Phospholipidsubstrate. BEPC und BPC auf Kieselgelplatten a) ermittelt bei 800 V b) bei 950 V

2.5.5. Ermittlung der optimalen Substratkonzentration für die Messung der PLA₂-Aktivität in Zellsuspensionen

Bei Untersuchungen mit einer zu hohen BEPC-Konzentration könnten zellschädigende Effekte durch aus dem Substrat gebildeten Produkte auftreten. Um dies zu minimieren, wurde eine minimale Substratkonzentration ermittelt, bei der sich die Aktivität der PLA₂ in Zellen gut messen läßt. Es wurde End-Konzentrationen von 1 μM , 2 μM , 5 μM und 10 μM BEPC getestet. Das zuvor mit Ultraschall behandelte Substrat im Nährmedium wurde zu den Zellen zugesetzt und nach 2, 5, 10 und 20 min Inkubation wurden die Aliquots entnommen. Das Auftreten der PLA₂-Hydrolyseprodukte konnte bei allen o.g. BEPC-Konzentrationen gut detektiert werden. Die Menge der gebildeten BE-LPC pro Zeiteinheit war direkt proportional den verwendeten Konzentrationen an BEPC (s.Abb.4.). Anhand dieser Daten und unter Berücksichtigung der Streuung der Meßwerte wurde die Aktivität der PLA₂ in Zellsuspensionen bei einer BEPC-Konzentration von 2 μM gemessen.

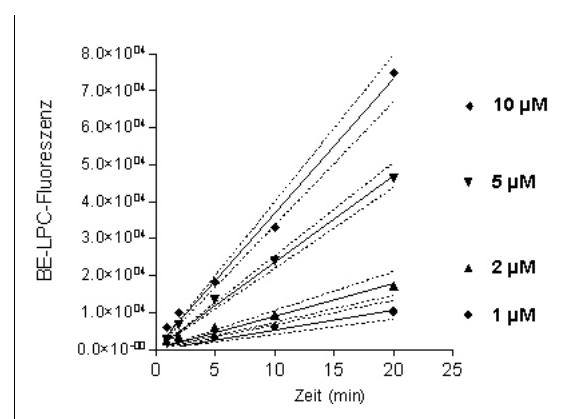


Abb. 4. Kinetik der Freisetzung von BE-LPC aus BEPC bei verschiedener Konzentration durch die PLA₂ der Zellen von *Eschscholzia californica*.

2.5.6. Detektion postchromatographisch gefärbter genuiner Phospholipide

Wegen des Fehlens von chromophoren Gruppen im natürlichen Phospholipidmolekül besteht die Notwendigkeit zur Sichtbarmachen dieser Verbindungen mit speziellen Farbreagenzien.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die postchromatische Färbung mit einer Mischung aus Kupfersulfat/Phosphorsäure (modifiziert nach Touchstone et al., 1983). Die DC-Platten wurden 2 min lang bei 120° C erwärmt und nach dem Abkühlen in eine Färbelösung (0.626 M Kupfersulfatpentahydrat mit 8%-iger Phosphorsäure) getaucht. Anschließend wurden diese Platten erneut auf einer Thermoplatte auf eine Temperatur von ~160-170°C für 2-4 min erhitzt. Die Quantifizierung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe eines Densitometers CD 60 (Desaga, Deutschland) im Extinktionsmodus bei einer Wellenlänge von 390 nm.

Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage der ermittelten Peakfläche in Bezug zu den aufgetragenen Standards.

2.6. Ermittlung der Massenspektren von Phospholipiden

Die Ermittlung der Massenspektren von Phospholipidmetaboliten erfolgte (Kooperation: M. Petkovic, Dr. Arnhold, Leipzig) nach Müller et al. (2001) über MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Zunächst wurden die Extrakte (Chloroform/Methanol) in einem Exsikkator getrocknet und mit der Matrixlösung (0.5 M 2,5-dihydroxybenzeonsäure in Methanol mit 0.1% Trifluoressigsäure) resuspendiert. Das Volumen der Matrixlösung entspricht dem Probenvolumen vor dem Eindampfen. 1.8 µl Proben-Matrix-Gemisch wurde dann auf den Probenhalter gebracht und unter Zufuhr von warmer Luft getrocknet.

Das Trocknen führt zu einer homogenen Kristallisation auf dem Probenhalter. Die MS-Messungen erfolgten an einem Voyager Biospektrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Dieses System besitzt einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm. Der Druck in der Ionenkammer betrug zwischen 1×10^{-7} und 4×10^{-7} Torr. Die Extraktion der Ionen erfolgte im verzögerten Modus bei einer Spannung von 20 kV. Bei diesem Modus gelangen die Ionen nach der Beschleunigung in die feldfreie Flugstrecke von 2 m bis zum Reflektor. Die Proben wurden bei jeder Messung 128 mal mit Laser beschossen, mit einer Bestrahlungsstärke, die mit 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylinositol als Standard geeicht wurden war.

2.6.1. Phospholipidextraktion für die Analyse mit MALDI-TOF-MS

2.6.1.1. Phospholipidextraktion aus den Plasmamembranvesikeln

50 µl gereinigte Plasmamembranvesikel in Suspensionspuffer wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit 100 µl Chloroform/Methanol-Mischung 1:4 versetzt. Nach 30 min Schütteln wurde 50 µl 150 mM NaCl und 80 µl Chloroform zugesetzt. Danach wurden die Proben 20 min lang bei 4°C aufbewahrt, um eine Phasentrennung zu erreichen.

Die untere organische Phase der Proben wurde entnommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl Chloroform aufgenommen und anschließend zur Messung eingesetzt.

2.6.1.2. Phospholipidextraktion aus Zellsuspensionen nach Elicitor-Behandlung

Für die Analyse der Zellextrakte mit MALDI-TOF-MS wurden 4-5-Tage alte Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit 100 mM Sorbitol gewaschen und anschließend in einer phosphatfreien, 75%-igen Nährlösung resuspendiert. Zu 2 ml Zellsuspensionen mit einer Frischmasse von 50 mg/ml im Kolben wurde 2 µg/ml Elicitor zugesetzt. Nach 2 min, 5min, 10 min und 20 min wurden jeweils 500 µl Zellsuspension entnommen und mit 1.0 ml Stopplösung (Chloroform/Methanol 1:4) versetzt. Nach 30 min wurde 500 µl 150 mM NaCl-Lösung, und nach weiteren 20 min 800 µl Chloroform zugesetzt. Um eine gute Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben dann für 20 min bei 4°C aufbewahrt. Von den unteren Chloroformphasen wurde mit Hilfe einer Spritze 1 ml entnommen und unter Stickstoffzufuhr abgedampft. Das Resuspensionsvolumen betrug ein Zehntel des Extraktionsvolumens der Zellen (50 µl Chloroform).

2.6.1.3. Gewinnung einer Lysophospholipid-Fraktion aus der Plasmamembran

Zu 50 µl Plasmamembranvesikeln in Suspensionspuffer wurden 50 µl MOPS-KOH pH 7.5 und 10 µl PLA₂-Lösung (PLA₂ aus *Apis mellifera*, 1.225 U/mg, 2.4 U/µl) zugesetzt, und 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Chloroform/Methanol-Mischung 1:4 gestoppt. Nach 30 min Schütteln wurden 100 µl 150 mM NaCl und 160 µl Chloroform zugesetzt. Danach wurden die Proben 20 min bei 4°C aufbewahrt. Die untere organische Phase wurde mit Hilfe eines TLC-TLC-Applikators auf Kieselgel-60-Platte aufgetragen. Danach erfolgte die Trennung der Proben in einer

Horizontalkammer mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65+25+4. Eine Spur (ca. 2 cm) der Platte wurde mit dem Kupfersulfat-Reagenz (Kap.2.5.6) angefärbt.

Die Abschnitte mit gleichem R_f -Wert wie die angefärbte LPC-Bande wurden von dem Rest der Platte mit Hilfe einer Rasierklinge ausgekratzt, in Methanol aufgenommen und 30 min lang geschüttelt, anschließend 20 min lang bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Stickstoff abgedampft. Der getrocknete Rest wurde in 96 % Ethanol resuspendiert.

2.7. Sonstige Methoden

2.7.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinproben erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Ablesen der Extinktion bei 590 nm erfolgte in einem Photometer Ultrospec-3000 (Pharmacia). Die Auswertung der Messungen erfolgte auf der Basis von Eichkurven mit Rinderserumalbumin.

2.7.2. Bestimmung der Vesikelgröße

Die Vesikelgröße in Suspensionen wurde mittels Laserinterferometrie in einem *Zetasizer-4* (Malvern Instruments Ltd.) bestimmt.

2.7.3. Bestimmung von Benzophenanthridin-Alkaloiden

Zu 0.5 ml Zellsuspension wurden 0.5 ml Extraktionsmittel (100 ml Methanol+720 μ l 5N HCl) zugegeben und 20 min bei 40°C im Thermomixer geschüttelt. Nach der Extraktion wurden die Proben 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Überstandes in einem Spektrofluorophotometer RF-5000 (Shimadzu) bei einer Excitationswellenlänge von 460 \pm 5 nm, Emission 570 \pm 10 nm gemessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte auf Basis einer Eichkurve mit Sanguinarin.

2.7.4. Einschluß von Glutathion in den Vesikeln durch Elektroporation

Die Membranvesikel wurden in Elektroporationspuffer (10 mM MOPS-BTP pH 7.0 mit 330 mM Saccharose ohne KCl und DTE) aufgenommen, die Vesikelmenge über die optische Dichte bei 550 nm ermittelt und durch entsprechendes Verdünnen auf einen konstanten Wert (OD=1.6) gebracht. Die Vesikelsuspension wurde mit 20 mM GSH-Lösung (im gleichen

Puffer) im Verhältnis 3:1 gemischt. Von der Mischung wurden 90 μl Probe entnommen und in Elektroporationsküvetten (1mm Elektrodenabstand) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gerät der Firma Biotechnologies & Experimental Research INC bei 50 μF , 720 Ohm und unterschiedlichen, jeweils optimierten Spannungen.

Nach der Elektroporation wurden die OD der Proben bei 550 nm gemessen. Dann wurden 80 μl in Eppendorffubes gegeben, mit Elektroporationspuffer 1:20 verdünnt, 15 min bei 15400 U/min zentrifugiert und anschließend die Pellets nochmals in 1ml Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in 80 μl Elektroporationspuffer resuspendiert.

2.7.5. Bestimmung von Glutathion

Die Bestimmung von Glutathion (GSH) erfolgte in einer modifizierten Form nach Coleman (1997) unter Verwendung von Monochlorobiman (MCB) (s. Abb. 5.), welches mit GSH ein fluoreszierendes Konjugat bildet. Diese Reaktion wird durch Zusatz von Glutathion-S-Transferase gestartet.

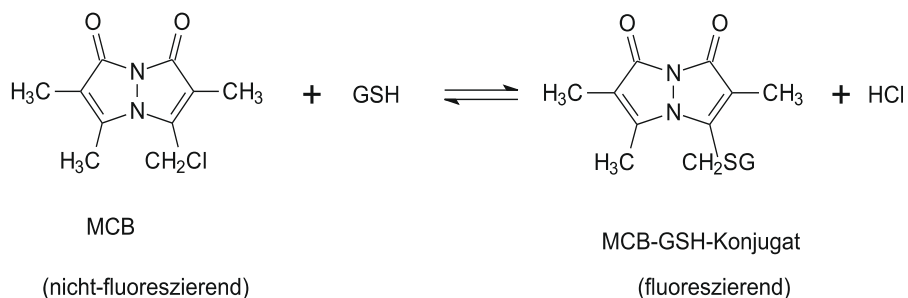


Abb.5. Reaktion zwischen Monochlorobiman und Glutathion (GSH)

Messansatz:

-16 μl Monochlorobiman (1 mM), 2 μl Glutathion-S-Transferase (0.1 u/ μl), 62 μl Puffer, 80 μl Probe Der Puffer ist 10 mM MOPS-BTP pH 7.0 mit 330 mM Saccharose ohne DTE. Die Reaktion wurde 15 min lang bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 μl 10 %-iger Essigsäure gestoppt. Dann wurde die Fluoreszenz der Proben bei einer Excitationswellenlänge von 395 \pm 5 nm und bei Emissionswellenlänge von 470 \pm 10 nm, gemessen (Shimadzu RF-5000). Die für eine Quantifizierung von GSH notwendige MCB-Konzentration wurde an Hand einer Eichreihe ermittelt.

Die Abb.6 zeigt, dass Glutathion im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 μM mit 100 μM MCB vollständig umgesetzt werden kann, wie aus dem linearen Verlauf der Fluoreszenz- intensität mit steigender GSH- Konzentration abgeleitet werden kann.

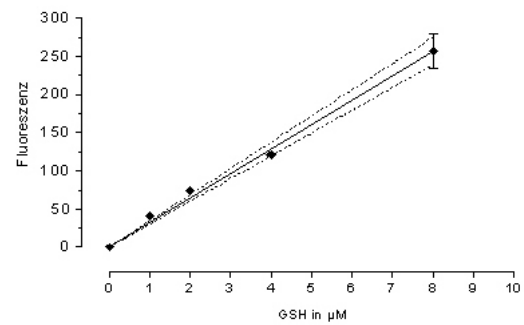


Abb.6. Eichkurve für die Quantifizierung von GSH. Der Anstieg der Geraden ($k= 32.05\pm 2.235$) diente als Faktor zur Berechnung des GSH-Gehaltes.

2.8. Chemikalien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die von anderen Firmen bezogenen besonderen Chemikalien und Geräte sind nachfolgend aufgeführt:

Chemikalien und Geräte

BPC

BEPC

Monochlorobiman

Elektroporationsküvetten mit 1mm Abstand

HBI (Hexabromoiridat (V))

HTPLC-Kieselgel-60 Platten

5 × 5 cm Horizontallaufkammer

10 × 10 cm Horizontallaufkammer

Zeta-Sizer-4

Elektro ECM 600

Spektrofluorometer RF-5000

Herkunft

Molecular Probes

-----//-----

-----//-----

Eppendorff

Alfa (Johnsen Mathy GmH)

Merck (Deutschland)

-----//-----

Camag (Schweiz)

Malvern Instruments Ltd

Biotechnologies & Experimental
Research INC (USA)

Shimadzu (Japan)