

**Isolierung und Charakterisierung der humanen  
UDP-D-Xylose: Proteoglykan-Core-Protein  $\beta$ -D-  
Xylosyltransferase**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Joachim Kuhn**  
aus Illingen/Saar

Bielefeld / Bad Oeynhausen  
2000

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. med. Knut Kleesiek

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin  
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen  
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum  
in Bad Oeynhausen

in der Zeit von

September 1995 - Oktober 2000

**Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.**

François Rabelais, écrivain (vers 1494-1553)

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie das in vielen hilfreichen Diskussionen und vielfältigen Anregungen gezeigte ständige Interesse an diesem Thema.

Herrn Professor Dr. Harald Tschesche, Fakultät der Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die externe Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Thomas Brinkmann gilt mein besonderer Dank für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und für die ermutigende Betreuung des Projekts.

Herrn Dipl.-Biol. Christian Götting bin ich für Rat, Kritik und Anregung während der Arbeit sehr dankbar.

Frau Anne-Katrin Vollmer, Frau Annemarie Peters und Frau Anja Reuße-Kaup danke ich für ihre exzellente technische Unterstützung.

Für die Überlassung der Bikunin-Klone möchte ich mich bei Dr. Christian Weilke bedanken.

Frau Dr. Martina Schnölzer und Herrn Dr. Tore Kempf, Zentrale Proteinanalytik des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, danke ich für ihre engagierte Unterstützung durch die MALDI-Analyse von Proteinen und die Proteinsequenzanalyse.

Bei Herrn Shing-Kit Lee, Technische Fakultät der Universität Bielefeld, möchte ich mich für die Hilfestellung bei der Kultivierung von Zellen auf Mikroträger-Kügelchen bedanken.

Für die vielen aufmunternden Diskussionen bin ich Frau Dipl.-Biol. Christina Bade-Döding, Medizinische Hochschule Hannover, sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Zeppezauer, Fakultät für Chemie der Universität des Saarlandes, der mich für die Proteinchemie begeistert hat.

Herrn Stefan Schmitt danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums Nordrhein-Westfalen danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

	Seite
<b>1. Zusammenfassung</b>	1
<b>2. Einleitung</b>	2
2.1 Proteoglykane	2
2.2 Glykosyltransferasen	4
2.2.1 Klassifizierung, Struktur, Funktion	4
2.2.2 Isolierung	6
2.3 Xylosyltransferase	8
<b>3. Aufgabenstellung</b>	13
<b>4. Ergebnisse</b>	14
<b>4.1 Isolierung der Xylosyltransferase</b>	14
4.1.1 Xylosyltransferase-Aktivitätstest	14
4.1.1.1 Substratspezifität der Xylosyltransferase	14
4.1.1.2 Darstellung von rekombinantem Bikunin bzw. [ $V^{36}$ , $V^{38}$ ] $^{\delta 1}$ , [ $G^{92}$ , $I^{94}$ ] $^{\delta 2}$ Bikunin	16
4.1.1.3 Charakterisierung des XT-Reaktionsprodukts	17
4.1.1.4 Chemische Modifikation als Mittel zur Einführung von Reportergruppen	20
4.1.2 Wahl und Produktion des Ausgangsmaterials zur Aufreinigung der XT	23
4.1.2.1 XT-Bildungsrate diverser Zelllinien	24
4.1.2.2 JAR-Zellen in einem serumhaltigen bzw. serumfreien Zellkulturmedium	25
4.1.2.3 <i>Scale-up</i> der JAR-Kultivierung	27
4.1.3 Lösen der Xylosyltransferase	30
4.1.4 Stabilität der Xylosyltransferase	30
4.1.4.1 pH-Wert	31
4.1.4.2 Oxidations- und Reduktionsempfindlichkeit der Xylosyltransferase	32
4.1.4.3 Polarität und Ionenstärke des Mediums	32
4.1.4.4 EDTA als Komplexierungsmittel für schädliche Metallionen	34
4.1.5 Konzentrierung und Aufreinigung der Xylosyltransferase	34
4.1.5.1 Vakuumkonzentrierung, Lyophilisation, Ultrafiltration bzw. Diafiltration	35
4.1.5.2 Optimierung der Ammoniumsulfatpräzipitation	37
4.1.5.3 Proteinauftrennung an Ionenaustauschermedien	38

Inhalt	VI
4.1.5.4 Proteinauftrennung durch Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen	38
4.1.5.5 Affinitätschromatographie	40
4.1.5.6 Isoelektrische Fokussierung und isoelektrischer Punkt der Xylosyltransferase	44
4.1.6 Kombination der Reinigungsschritte und Isolierung der Xylosyltransferase	44
4.1.6.1 Ausgangsmaterial zur Isolierung der Xylosyltransferase	44
4.1.6.2 Abtrennung großer Proteinmengen	45
4.1.6.3 Heparin-Affinitätschromatographie	45
4.1.6.4 Auftrennung durch elektrostatische Wechselwirkungen	46
4.1.6.5 Aufreinigung an immobilisiertem Protamin	46
4.1.6.6 Übersicht über die kombinierten Reinigungsschritte	48
<b>4.2 Charakterisierung der Xylosyltransferase</b>	<b>48</b>
4.2.1 Reinheit der isolierten Xylosyltransferase	48
4.2.1.1 Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität	48
4.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigter Xylosyltransferase	49
4.2.2 Proteinsequenzanalyse	50
4.2.3 Molekulargewicht der Xylosyltransferase	51
4.2.4 Nachweis der N-glykosidischen Modifikation der Xylosyltransferase	52
4.2.5 Aktivierung und Inhibierung der Xylosyltransferase	52
<b>4.3 Immunchemie</b>	<b>53</b>
4.3.1 Antigen-Antikörper-Reaktion	54
4.3.2 Immundetektion der Xylosyltransferase	56
4.3.3 Inhibierung der XT-Aktivität durch Anti-Peptid-Antikörper	57
<b>5. Diskussion</b>	<b>58</b>
5.1 Wahl und Herstellung des xylosyltransferasehaltigen Ausgangsmaterials	59
5.2 Anreicherung und Isolierung der Xylosyltransferase	60
5.3 Charakterisierung der Xylosyltransferase	62
5.4 Ausblick	65
<b>6. Material und Methoden</b>	<b>67</b>
6.1 Bestimmung des Proteingehalts in Flüssigkeiten	67
6.2 Xylosyltransferase-Aktivitätstest	67
6.2.1 Präparation des Akzeptors Seidenfibroin	67

---

6.2.2	Darstellung der Akzeptoren Bikunin und $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$ Bikunin	67
6.2.3	Radioaktiver Aktivitätstest	68
6.3	Untersuchung der Eigenschaften der Xylosyltransferase	68
6.3.1	Chemische und physikalische Einflußgrößen	68
6.3.2	Synthese von potentiellen XT-Inhibitoren	69
6.3.3	Bestimmung der inhibitorischen Wirkung	69
6.3.4	N-Glykosidase F-Abbau	69
6.4	Zellkultur	70
6.4.1	Kultivierung humaner Zelllinien	70
6.4.1.1	Passagieren von adhärenenten Zellen	70
6.4.1.2	JAR-Zellen	71
6.4.1.3	Rollerkulturflaschen	71
6.4.1.4	Spinnerkultivierung	72
6.4.1.5	3-D-Kultivierung	73
6.4.1.6	Bestimmung der Zellzahl	73
6.4.1.7	Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	74
6.4.1.8	Analyse des Zellkulturüberstandes	74
6.4.2	Kultivierung von Bakterien	74
6.4.2.1	Anzucht und Vermehrung von <i>E. coli</i>	75
6.4.2.2	Induktion der Proteinexpression	75
6.4.2.3	Lösen und Reinigen des Expressionsprodukts	76
6.4.2.4	Herstellung einer Kryokultur	77
6.5	Untersuchungen zur Aufkonzentrierung des Enzyms	77
6.5.1	Entfernen von flüchtigen Substanzen mit dem Bachhofer Vakuumkonzentrator	77
6.5.2	Gefriertrocknen	78
6.5.3	Ultra- und Diafiltration	78
6.5.4	Ammoniumsulfatfällung	79
6.6	Proteinchemische Untersuchungen der Xylosyltransferase durch elektrochemische Verfahren	80
6.6.1	Native isoelektrische Fokussierung	80
6.6.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	80
6.6.3	Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen	82
6.6.3.1	Coomassie-Färbung	82
6.6.3.2	Silberfärbung	83
6.6.4	Proteinblotting (Elektroblotting)	84
6.7	Chromatographische Techniken	85
6.7.1	Gelfiltrations-Chromatographie (GFC)	85

Inhalt	VIII
6.7.2 Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)	85
6.7.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	87
6.7.4 Immobilisierung von Liganden und Affinitätschromatographie	87
6.7.4.1 Kopplung über Aldehyde	87
6.7.4.2 Kopplung über Epoxide	88
6.7.4.3 Biotin-Streptavidinkopplung	89
6.7.4.4 Kopplung über Divinylsulfoxid	90
6.7.4.5 Synthese und Kopplung homopolymerer UDP-Ketten	91
6.7.4.6 Ligandenchromatographie	91
6.7.4.7 Chromatographie an monomerem Avidin	92
6.7.5 Flüssigkeitschromatographie an unpolaren stationären Phasen	93
6.8 Immunologische Techniken	93
6.8.1 Polyklonale Antikörper	93
6.8.2 <i>Dot-blot</i> -ELISA	93
6.8.3 Western-Blot	94
6.8.4 Immundetektion	94
6.8.5 Immobilisierung des Antigens	94
6.8.6 Antikörperreinigung	95
6.8.7 Herstellung einer Immunaффinitätssäule	95
6.8.8 Immunaффinitätschromatography	96
6.9 Dreikomponentenvernetzung	96
6.9.1 Photoinduzierte Aktivierung der Azidgruppe von SAED	97
6.9.2 Synthese des SAED-Xylosyltransferase-Substrats	98
6.9.3 Photoinduzierte Vernetzung	98
6.10 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	99
6.11 Aminosäuresequenzanalyse der XT	99
<b>7. Material und Geräte</b>	<b>100</b>
7.1 Zelllinien	100
7.2 Bakterienstämme	100
7.3 Reagenziensätze	100
7.4 Reagenzien	101
7.5 Geräte	102
7.6 Sonstige Materialien	103



---

<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b>	105
<b>9.</b>	<b>Literatur</b>	108
<b>10.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	118

## 1. Zusammenfassung

*UDP-D-Xylose: Proteoglykan-Core-Protein β-D-Xylosyltransferase* (EC 2.4.2.16, XT) initiiert die Biosynthese von Glykosaminoglykan-Seitenketten in Proteoglykanen durch den Transfer der Xylose von UDP-Xylose auf spezifische Serinreste des Core-Proteins. Die meisten Glykosyltransferasen, die an der Biosynthese der Glykosaminoglykane beteiligt sind, wurden bereits isoliert und charakterisiert. Dagegen war die Aminosäuresequenz und Struktur der XT bisher völlig unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym erstmals isoliert und charakterisiert.

Die Aufreinigung der XT wurde bisher aus tierischem Gewebe versucht. XT im Zellkulturüberstand zeichnet sich dagegen durch eine größere Reinheit aus. Hierzu wurde die Enzymaktivität im Überstand diverser Zelllinien mit Hilfe eines neuen radiochemischen XT-Tests gemessen. Dabei zeigte sich eine besonders hohe XT-Bildungsrate für JAR-Chorionkarzinom-Zellen. Es gelang die Adaption dieser Zellen an eine serumfreie Kultivierung, die zu einer 19fachen Steigerung der spezifischen XT-Aktivität im Zellkulturüberstand führte. Darüber hinaus konnte ein Zellkultivierungssystem entwickelt werden, bei dem JAR-Chorionkarzinom-Zellen in Hybrid-Hohlfaserbioreaktoren unter serumfreier Kultivierung XT in großer Menge, hoher Konzentration und hoher spezifischer Aktivität produzieren.

Die XT konnte aus 18,5 Liter (entsprechen 2000 Liter normalem Überstand) angereichertem JAR-Zellkulturüberstand durch eine Kombination von Ammoniumsulfatfällung, Heparin-Affinitätschromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und Protamin-Affinitätschromatographie isoliert werden. Bei einer Gesamtausbeute von 1 % wurde hierbei eine 4700fache Aufreinigung des Enzyms erreicht.

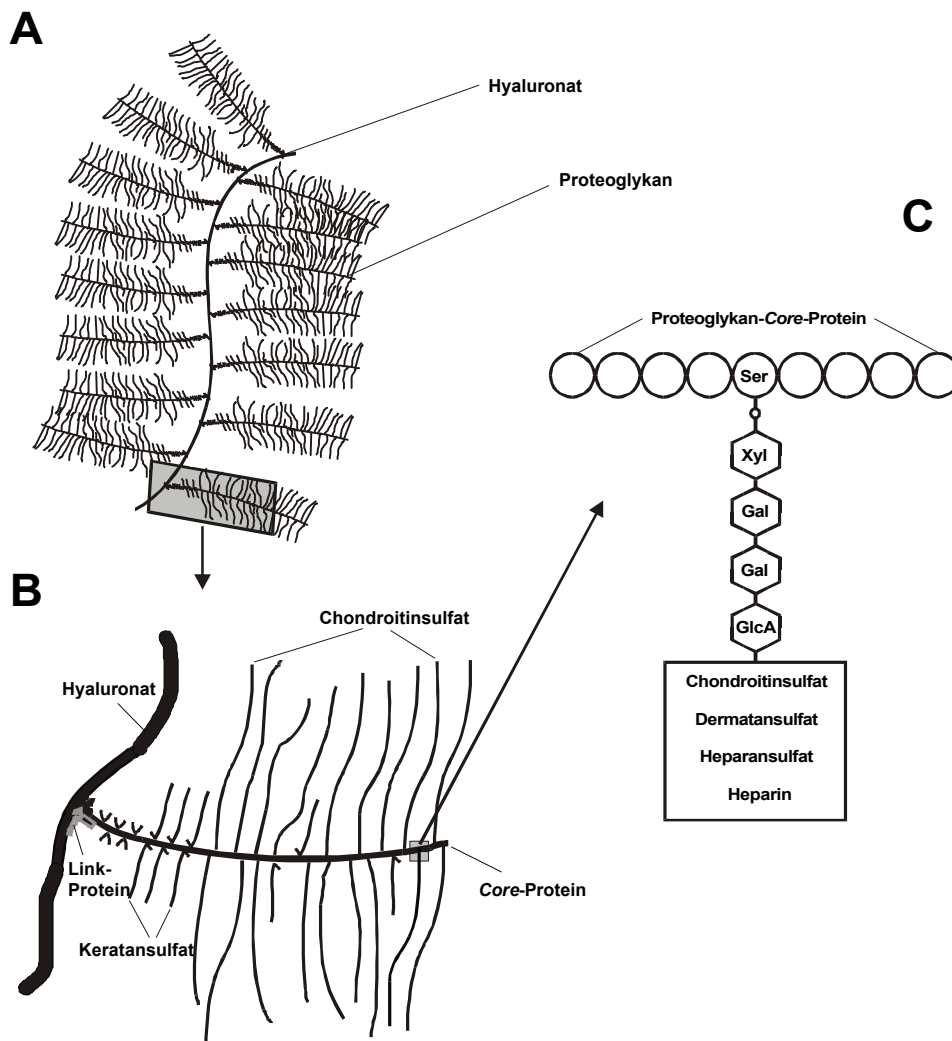
Im SDS-Gel zeigte sich die gereinigte XT als eine Einzelbande bei 120 kDa. Unter nativen Bedingungen wurde ein Molekulargewicht der XT durch Gelfiltrations-Chromatographie von 500 kDa bzw. 120 kDa bestimmt. XT ist ein Glykoprotein, da sich das Molekulargewicht des Proteins durch N-Glykosidase F-Abbau um ca. 3 % verringert. Das isolierte Protein wurde enzymatisch durch Trypsin und Endoproteinase Lys-C gespalten. Nach der Auftrennung des Peptidgemischs durch RP-HPLC wurden 11 Peptidfragmente durch Edman-Abbau sequenziert. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen zeigten keinerlei Homologie zu bekannten Sequenzen in Protein- oder EST-Datenbanken.

Auf der Grundlage dieser Sequenzen wurden Antikörper gegen das synthetische XT-homologe Peptide CSRQKELLKRKLEQQEK hergestellt. Nach Immobilisierung der gereinigten Antikörper konnte die XT in einer Immun-Affinitätschromatographie gebunden und durch das synthetische Antigen spezifisch eluiert werden. Mit diesen Antikörpern konnte zudem die XT durch *Western-Blot*-Analyse detektiert werden. Ein Antiserum gegen das synthetische XT-homologe Peptid CQFSEVGTDWDAKER führte zu einer etwa 50 %igen Inhibition der Enzymaktivität. Die immunologischen Untersuchungen beweisen, daß es sich bei dem isolierten Protein um das gesuchte Enzym, die Xylosyltransferase, handelt.

## 2. Einleitung

### 2.1 Proteoglykane

Proteoglykane (PG) bilden die Grundsubstanz des Bindegewebes. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe heterogener Makromoleküle, deren Untereinheiten aus Polysacchariden (ca. 95 %) und Proteinen (ca. 5 %) bestehen [1]. Glykosaminoglykane (GAG), die Polysaccharide der Proteoglykane [2, 3], sind aus repetitiven Disaccharideinheiten aufgebaut, die entweder aus sulfatiertem N-Acetylgalactosamin (Chondroitinsulfat, Dermatansulfat) oder sulfatiertem N-Acetylglucosamin (Heparin, Heparansulfat, Keratansulfat) und einer Uronsäure (Glucuronsäure, Iduronsäure) bzw. Galactose bestehen [4]. In Proteoglykanen sind diese Polysaccharidketten mit einem Polypeptidrückgrat (Core-Protein) verknüpft (Abb. 1).



**Abb. 1** Schematische Darstellung eines großen Proteoglykanaggregats (A). Die Proteoglykanmonomere gehen in gleichmäßigen Abständen von den Seiten eines langen zentralen Hyaluronatfilaments aus. Das Proteoglykan-Core-Protein ist substituiert mit unterschiedlichen Glykosaminoglykanen (B). Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin sind über Xylose an ganz bestimmte Serinreste des Core-Proteins gebunden (C).

Die vielfältigen Funktionen der PG, die von rein mechanischer Stützfunktion bis zu verschiedenen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, Proliferation und Differentiation reichen [5, 6], spiegeln sich teilweise in den biomechanischen Eigenschaften des Bindegewebes wie Viskoelastizität, Dehnbarkeit, Reißfestigkeit, Scher- und Drehstabilität wider [4]. Matrixbildende Spezies der PG wie das Aggrecan, das einen auf sein Molekulargewicht bezogenen Glykosylierungsgrad von fast 90 % besitzt, tragen maßgeblich zu diesen Eigenschaften bei. Die Heparansulfatketten der Heparansulfat-Proteoglykane fungieren als kritische Mediatoren in biologischen Prozessen und sind z. B. involviert in die Regulation des mesodermalen Zellschicksals, der Positionierung des Herzens, der Vasculargenese und Angiogenese nach ischämischer Kontraktur, der Proliferation von glatten Muskelzellen und dem Metabolismus von Lipoproteinen [7-11].

Aggrecan ist das am besten untersuchte PG und soll deshalb hier beispielhaft etwas genauer beschrieben werden. Neben den wichtigen Funktionen der Matrixbildung, der Wasserbindung, der Regulation der Filtration von kleinen und größeren Molekülen und der großräumigen Ladungsverteilung spielt es aufgrund seiner unterschiedlichen Proteindomänen sehr wahrscheinlich bei der Zellerkennung, der Zelladhäsion und in immunologischer Hinsicht eine wichtige Rolle [12]. Aggrecan besitzt ein großes *Core*-Protein von 225-250 kDa. An das *Core*-Protein sind über die Seitenkette des Serins Chondroitinsulfatketten gebunden. Das *Core*-Protein trägt außerdem Keratansulfatseitenketten und N- und O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide. Der N-Terminus des Proteins trägt eine Hyaluronatbinderegion, die nichtkovalent an Hyaluronsäureketten bindet [12]. Stabilisiert wird diese Bindung durch ein strukturanaloges *Linker*-Protein. Bis zu 100 Aggrecan- und *Linker*-Proteine sind so mit einer Hyaluronsäurekette verbunden und bilden hierbei große Aggregate von Molekularmassen von insgesamt etwa  $2 \times 10^8$  Da.

Weitere in vielen Bindegeweben weit verbreitete PG sind die niedermolekularen, leucinreichen Moleküle Decorin, Biglycan und Fibromodulin [13]. Decorin und Fibromodulin spielen offensichtlich eine bedeutsame Rolle beim Aufbau der extrazellulären Matrix, da beide Moleküle bei *in vitro* Versuchen an Kollagentyp I und II binden. Biglycan bindet dagegen nicht an Kollagen. Es wurde nachgewiesen, daß Biglycan an der Zelloberfläche akkumuliert [12].

PG, die eine wichtige Rolle bei Zelloberflächenfunktionen spielen, sind die membranständigen Zelloberflächenproteoglykane Syndecan, CD44 und Thrombomodulin. Die Moleküle strukturieren sich aus einer kurzen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer transmembranen Domäne und einer großen extrazellulären Domäne, die bei Syndecan und

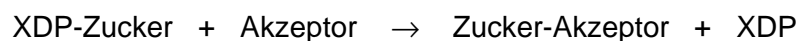
CD44 sowohl Chondroitinsulfat- als auch Heparansulfatketten, bei Thrombomodulin nur Chondroitinsulfatketten trägt [12]. Über diese Strukturen werden Zell-Matrix-Wechselwirkungen vermittelt, und es erfolgt die Steuerung von Zelladhäsion, Zellmotilität sowie die Interaktion zwischen den Zellen. Eine Reihe von Proteoglykanen, wie z. B. Decorin und Betaglycan binden Wachstumsfaktoren und Zytokine und tragen dadurch zur Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung bei [14-17].

Die Biosynthese der PG [18] beginnt mit der Transkription der *Core*-Protein-Gene der verschiedenen PG im Nukleus. Nach der Synthese und Prozessierung der mRNA(s) erfolgt deren Translation an den membrangebundenen Polysomen im rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER). Der initiale Schritt der Glykosylierung findet wahrscheinlich post-translational auf dem Weg durch das endoplasmatische Retikulum statt. Nach der Translokation vom RER zum Golgi-Apparat erfolgt dort die Kettenverlängerung durch den sukzessiven Transfer aktivierter Zucker. Im Golgi-Apparat findet auch die Sulfatierung der Glykosaminoglykanketten mit aktiviertem Sulfat statt.

## 2.2 Glykosyltransferasen

### 2.2.1 Klassifizierung, Struktur, Funktion

Die Glykosyltransferasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die die Synthese spezifischer Glykoside durch den Transfer von Monosacchariden von einem Glykosylnukleotid-Donatorsubstrat (Nukleotidzucker) auf ein Akzeptorsubstrat nach der folgenden Reaktionsgleichung katalysieren:

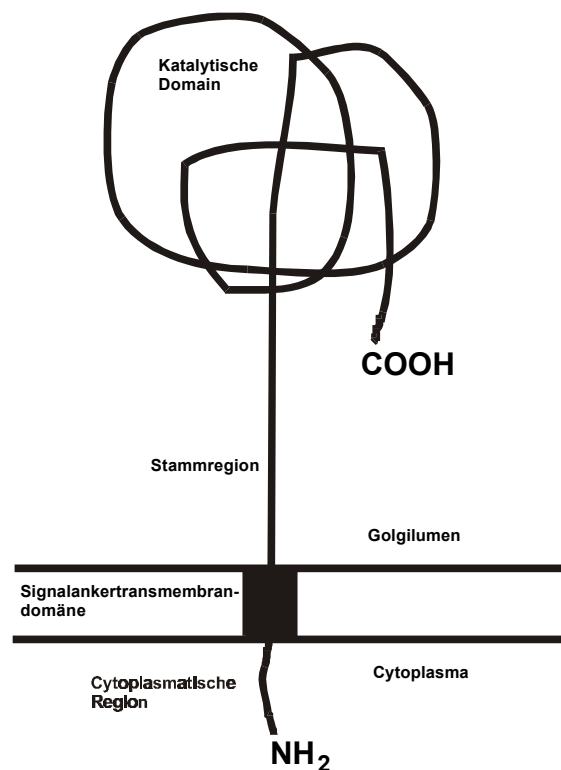


XDP-Zucker ist hierbei der Nukleotidzucker. Akzeptorsubstrat kann ein Oligosaccharid, ein Lipid oder ein Polypeptid sein. Eine Klassifizierung der Glykosyltransferasen in Familien erfolgt nach der Art des Zuckers, der übertragen wird. Danach lassen sich die Glykosyltransferasen einteilen in Glucosyltransferasen, Galactosyltransferasen, Fucosyltransferasen, Xylosyltransferasen, N-Acetylglucosaminyltransferasen, N-Acetylgalactosaminyltransferasen und Sialyltransferasen.

Glykosyltransferasen zeigen hinsichtlich des Akzeptorsubstrats eine bemerkenswerte hohe Spezifität, so daß in biologischen Systemen, gemäß des *One enzyme-one linkage*-Konzepts [19], eine charakteristische glykosidische Bindung durch eine spezifische Transferase

katalysiert wird. Im Hinblick auf die hohe Spezifität der Glykosyltransferasen und die große Zahl unterschiedlicher Oligosacharidstrukturen in Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen, Polysachariden und deren Derivaten wird die Zahl der Glykosyltransferasen weit über 100 geschätzt [20, 21].

In Eukaryonten sind die meisten Glykosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat lokalisiert. Alle bisher charakterisierten Glykosyltransferasen, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind, zeigen eine ähnliche Domänenstruktur. Es sind alles Typ II-Transmembranproteine, die aus einer kurzen aminoterminalen cytoplasmatischen Region, einer Signalankertransmembrandomäne [22], einer stielartigen Region und einer großen carboxyterminalen katalytischen Domäne aufgebaut sind (Abb. 2) [23]. Trotz eines zu erwartenden gemeinsamen Golgi-Retentionssignals und der ähnlichen Domänenstruktur zeigen die bisher untersuchten Glykosyltransferasen nur sehr wenig Sequenzhomologie. Selbst bei Glykosyltransferasen, die zur gleichen Familie gehören und damit sehr ähnliche Akzeptor- und Donatorsubstrate erkennen, finden sich nur wenige homologe Aminosäuresequenzen [24]. Dagegen zeigt der Vergleich der Sequenzen ein und derselben Glykosyltransferase verschiedener Spezies große Homologien (80 % und mehr) [25, 26].



**Abb. 2** Topologie bzw. Domänenstruktur bekannter Glykosyltransferasen. Alle bisher bekannten Glykosyltransferasen besitzen eine Typ II-Topologie und sind aus einer katalytischen Domäne, einer Stammregion, einer Signalankertransmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Region aufgebaut.

Die von den Glykosyltransferasen katalysierten Glykosylierungsreaktionen haben sowohl für die Pro- als auch für die Eukaryonten eine enorme biologische Bedeutung [27]. Im Zusammenspiel der im Golgi-Apparat lokalisierten Glykosyltransferasen und Glykosidasen werden durch diese Reaktionen die zellulären Oligosaccharide determiniert. Hierbei spielt die subkompartimentäre Anordnung dieser Enzyme beim differenzierten Aufbau der Zuckerstrukturen offensichtlich eine entscheidende Rolle [28]. Unterschiedliche Untersuchungen weisen darauf hin, daß zelltypspezifische Glykosylierungssequenzen durch die Expression der Glykosyltransferasegene reguliert werden [29-31].

### 2.2.2 Isolierung

Als Ausgangsmaterial zur Aufreinigung und Isolierung von Glykosyltransferasen dient meist tierisches Gewebe [32-40]. Oft ist es sinnvoll, diese Aufreinigung nicht aus dem Gewebekomogenat, sondern aus den aus dem Gewebe präparierten Mikrosomen durchzuführen [39]. Obwohl die meisten Glykosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat lokalisiert sind, wurden einige auch als gelöste Enzyme in Körperflüssigkeit gefunden und konnten daraus bis zur Homogenität gereinigt werden [41-44].

Bisher wurde erst ein kleiner Teil der bekannten Glykosyltransferasen isoliert und kloniert. Das liegt offensichtlich daran, daß diese Transferasen nur in sehr geringer Konzentration in tierischen Geweben vorhanden sind. Beispielsweise wurde aus den zur Aufreinigung von UDP-N-Acetylglucosamine: $\alpha$ -6-D-mannoside  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase eingesetzten 300 g Nierengewebe nur 7,8  $\mu$ g des Enzyms gewonnen, und das bei einer Gesamtausbeute von 26 % und einem Aufreinigungsfaktor von 450.000 [32]. Ein weiterer Grund, der die Aufreinigung dieser Enzyme erschwert, ist die Tatsache, daß viele der Glykosyltransferasen an intrazelluläre Membranen gebunden sind und deshalb nicht nur die Aufreinigung, sondern auch das Lösen dieser Proteine spezielle Methoden erfordert. Vieler dieser Proteine sind zudem instabil oder verlieren ihre Aktivität durch Adsorption an Oberflächen.

Die ideale Methode zur Aufreinigung der Glykosyltransferasen ist die Affinitätschromatographie an Donator- oder Akzeptorsubstraten bzw. deren Derivaten, da mit dieser Methode, im Gegensatz zu anderen Verfahren, die Anreicherung aufgrund der hohen Substratspezifität dieser Enzyme sehr spezifisch erfolgen kann. Tatsächlich wurde die erste Glykosyltransferase bis zur Homogenität erst aufgereinigt, als entsprechende biospezifische Affinitätsmedien zur Verfügung standen [33, 34]. Da die Donatorsubstrate im Vergleich zu

den Akzeptorsubstraten der Glykosyltransferasen normalerweise kleinere Michaelis-Menten-Konstanten besitzen und damit gewöhnlich fester an das Enzym binden, sind sie im allgemeinen besser als Affinitätsmedium geeignet. Allerdings ist auch hier die Bindung des Enzyms an das Affinitätsmedium oft sehr schwach. So wurde z. B. bei der Aufreinigung der UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase III an UDP-Hexanolaminagarose das Enzym nicht an das immobilisierte Donatorsubstrat gebunden, sondern lediglich davon retardiert [35]. Nur durch mehrfache Wiederholung dieser Chromatographie konnte das Enzym dann doch angereichert werden. Der Grund für die offensichtlich schwache Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat kann natürlich auch die Folge der für die Immobilisierung notwendigen Derivatisierung des Substrats sein. In Anbetracht der hohen Substratspezifität der Glykosyltransferasen ist das sogar sehr wahrscheinlich.

In einer Art chemischen Mimikry können verschiedene synthetische Farbstoffe an Proteine binden. Dieses Bindungsverhalten wurde auch zur Aufreinigung diverser Glykosyltransferasen ausgenutzt. Beispielsweise konnte die humane UDP-N-Acetyl- $\alpha$ -D-galactosamin:polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase an *Cibacron 3GA* [36, 37] und die UDP-Glucose:ceramide Glucosyltransferase an *Green 19 dye* [38] angereichert werden.

Trotz des hohen Aufreinigungspotentials der Affinitätschromatographie ist zur Isolierung einer Glykosyltransferase praktisch immer die Kombination mehrerer unterschiedlicher Reinigungsmethoden notwendig. Das Aufreinigungsschema ist hierbei, ähnlich wie das auch bei der Aufreinigung anderer Proteine der Fall ist, individuell verschieden. Wenn geeignete Affinitätsmedien zur Verfügung stehen, reicht oft die Kombination von nur zwei Chromatographien zur Isolierung der Glykosyltransferase aus. Beispielsweise konnte aus dem Triton X-100 Extrakt von Nierengewebe die UDP-N-Acetylglucosamine: $\alpha$ -6-D-mannoside  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase durch die Kombination der Chromatographie an UDP-Hexanolaminagarose und der an einem an Agarose gekoppelten synthetischen Oligosaccharid-Inhibitor bis zur Homogenität aufgereinigt werden [32]. Dagegen waren zur Aufreinigung der UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase III insgesamt neun Arbeitsschritte erforderlich [35]. Nach der Extraktion von homogenisiertem Nierengewebe mit Triton X-100 erfolgte hierbei die sukzessive Aufreinigung an QAE-Sepharose, Hydroxylapatit,  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelat-Sepharose I, ConA-Sepharose,  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelat-Sepharose II, UDP-Hexanolaminagarose und Substrat-Sepharose. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Chromatographie an UDP-Hexanolaminagarose fünfmal nacheinander durchgeführt. Mit diesem Aufreinigungsschema konnten bei einer Gesamtausbeute von 1,5 % 35  $\mu\text{g}$  des Enzyms isoliert werden.



### 2.3 Xylosyltransferase

Die UDP-D-Xylose: Proteoglykan-Core-Protein  $\beta$ -D-Xylosyltransferase (EC 2.4.2.26, XT) initiiert die Synthese von Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Heparansulfat und Heparin beim Aufbau von PG durch die Übertragung der Xylose von UDP-Xylose auf die Hydroxylgruppe bestimmter Serinreste des Core-Proteins [45]:



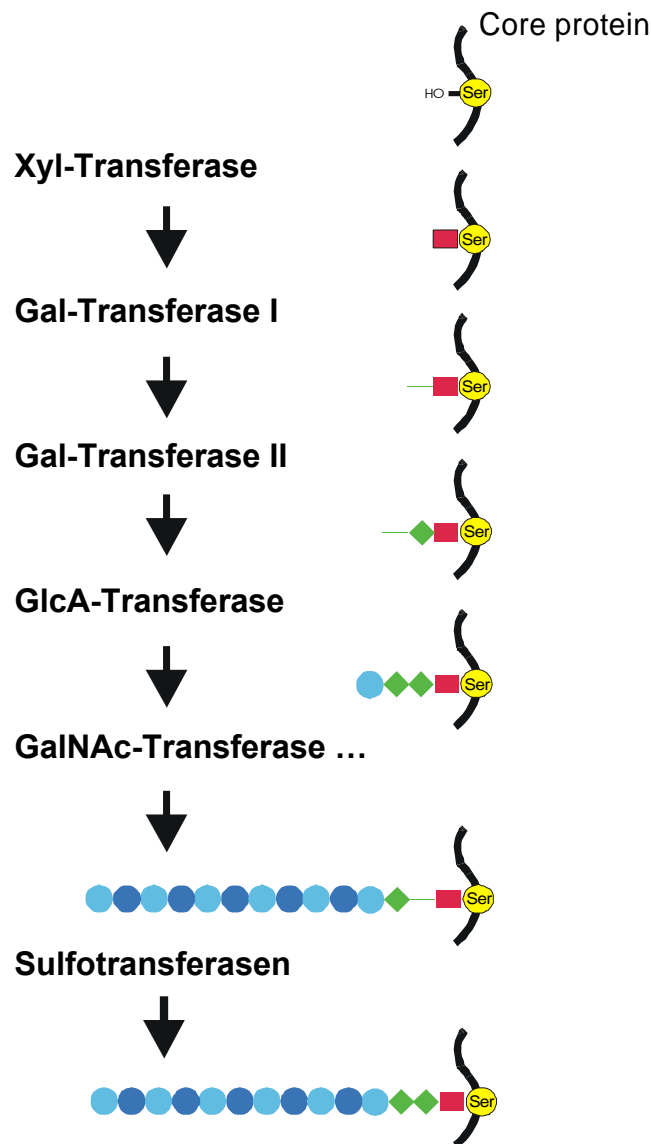
Dieser initiale Schritt beim Aufbau der GAG erfolgt posttranslational im Übergang vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex [46, 47] und ist offensichtlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GAG-Synthese [48]. Durch den nachfolgenden Transfer von zwei Galactosylresten, katalysiert durch die Galactosyltransferase I und II, sowie die Übertragung eines Glucuronsäurerestes, katalysiert durch die Glucuronyltransferase, wird die folgende, an das Coreserin gebundene Oligosaccharidsequenz aufgebaut:



Je nach GAG erfolgt an die Oligosaccharidsequenz der Aufbau eines linearen Polymers aus charakteristischen Disaccharideinheiten und die Sulfatierung des Polysaccharids an spezifischen Positionen durch Sulfotransferasen (Abb. 3). Für eine regulatorische Funktion der XT bei der GAG-Synthese spricht der durch die XT katalysierte initiale Schritt bei der Modifikation des Core-Proteins. Außerdem interagieren XT und Galactosyltransferase I miteinander [49, 50], und die Expressionen von XT und PG sind koordiniert [49].

Die XT erkennt nur bestimmte Serinreste eines Core-Proteins. Deshalb ist nur ein Teil der Serinreste in PG glykosyliert. Andere serinhaltige Proteine, wie z. B. Histone, Ferritin, Cytochrom C, Lysozym, Serum-Albumin, Ribonuclease und Casein, sind ebenfalls keine XT-Akzeptoren [51]. Bei Strukturuntersuchungen der Core-Proteine von PG zeigte sich, daß glykosylierte Serinreste gewöhnlich C-terminal von einem Glycinrest benachbart sind [52, 53]. Allerdings sind nicht alle Proteine, nicht einmal alle Core-Proteine von PG, die eine Ser-Gly-Sequenz enthalten, am Serin glykosyliert [54-56]. Der Vergleich der Aminosäuresequenz dreier glykosylierter PG sowie der Einsatz der von dieser Sequenz abgeleiteten synthetischen Peptide als XT-Akzeptoren führte zur Consensus-Sequenz S-G-x-G (x: variabel), mit sauren Aminosäuren auf der aminoterminalen Seite des Serins [57]. Die relative Bedeutung der einzelnen Positionen in der Consensus-Sequenz für die Erkennung der Sequenz durch die XT ergab sich nach einer systematischen XT-Akzeptorstudie der

abgeleiteten synthetischen Peptide wie folgt: Serin > erstes Glycin > zweites Glycin > saure Aminosäuren auf der aminoterminalen Seite des Serins. Diese Consensus-Sequenz, die als Erkennungssignal für die XT postuliert wurde, ist sowohl für die Entwicklung spezifischer Testsysteme für die XT als auch für die Aufreinigung des Enzyms über Affinitätsmedien von großer Bedeutung. Zur XT-Aktivitätsbestimmung wurden, bevor diese Sequenz bekannt war, chemisch deglykosylierte Proteoglykane aus Knorpel als Akzeptorsubstrat verwendet [58]. Die für die Deglykosylierung notwendigen extremen Reaktionsbedingungen führten jedoch zu schlecht reproduzierbaren Gemischen unterschiedlich fragmentierter Proteine [59-62].



**Abb. 3** Schematische Darstellung der Glykosaminoglykansynthese. Die Biosynthese von Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Heparin wird eingeleitet durch die Übertragung von Xylose ( ■ ) auf die Hydroxylgruppe bestimmter Serinreste ( ● ) des Proteoglykan-Core-Proteins. Dann erfolgt der Transfer einer Galactose ( ◆ ) durch die Galactosyltransferase I, einer weiteren Galactose ( ◆ ) durch die Galactosyltransferase II und einer Glucuronsäure ( ● ) durch die Glucuronyltransferase. Eine Differenzierung in die o. g. Glykosaminoglykane erfolgt beim weiteren Aufbau der Zuckerketten je nach der Übertragung weiterer Monosaccharide.

Unter der Annahme, daß das Ser-Gly-Paar einen essentiellen Teil der Substratstruktur der XT darstellt, wurde kurze Zeit später, noch bevor die o. a. Consensus-Sequenz bekannt war, ein XT-Aktivitätstest entwickelt, in dem das Seidenfibroin von *Bombyx mori* als exzellentes Akzeptorsubstrat für die XT fungiert [63]. Dieses Seidenfibroin enthält zum großen Teil das nichtglykosylierte repetitive Hexapeptid S-G-A-G-A-G. Beim näheren Betrachten des Hexapeptids wird deutlich, daß diese Sequenz bereits die erst später ermittelte Consensus-Sequenz für die XT enthält [57].

Durch neuere Untersuchungen wurde die Consensus-Sequenz bestätigt und auf der Grundlage dieser Sequenz ein hochspezifischer und sensitiver XT-Aktivitätstest mit rekombinantem Bikunin bzw. rekombinantem  $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$  Bikunin als Akzeptorsubstrat für die XT entwickelt [64, 65]. Mit diesem hochempfindlichen Test konnte die XT bei der Untersuchung des Probematerials von unterschiedlichen Spezies nur in tierischem Gewebe, nicht jedoch bei Pflanzen oder Einzellern nachgewiesen werden [66]. Möglicherweise ist die XT- und damit die PG-Synthese mit den GAG Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin auf das Tierreich beschränkt. Vergleicht man die XT-Sekretion unterschiedlicher Zellarten, dann sezernieren Chondrozyten, die u. a. große Mengen an PG produzieren, im Verhältnis zur Gesamtproteinsekretion am meisten XT [66]. Dagegen sezernieren Endothelzellen und Monozyten, die keine extrazelluläre Matrix aufbauen, am wenigsten XT. Die Quantifizierung der XT-Aktivität des Zellkulturüberstandes verschiedener humaner Zelllinien ergab für die plazentalen JAR-Choriokarzinom-Zellen den größten Wert [67].

Obwohl die Aufreinigung der XT in der Literatur eingehend beschrieben ist [58, 68, 69], existiert bis heute keine Aminosäuresequenz des Proteins. Die Struktur des Enzyms ist also noch völlig unbekannt. Stoolmiller *et al.* [58] setzten zur Aufreinigung der XT embryonalen Hühnerknorpel als Ausgangsmaterial ein, da dieser Knorpel im Gegensatz zu anderen Geweben wie z. B. Gehirn, Leber oder anderen Innereien eine sehr viel höhere XT-Aktivität zeigte. Die meisten Glykosyltransferasen sind sehr fest an das endoplasmatische Retikulum gebunden und deshalb nur schwer in Lösung zu bringen. Dagegen konnte die XT des embryonalen Hühnerknorpels mit einem Puffer, der lediglich 1 M KCl enthielt, aus dem Knorpelhomogenat extrahiert werden. Die Ausbeute betrug hierbei bis zu 95 %. Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des gelösten Proteins und anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation bzw. Gelfiltrations-Chromatographie wurde eine bis zu 50fache Aufreinigung des Enzyms erreicht.

Schwartz *et al.* [68, 69] verwendeten zur Aufreinigung der XT als Ausgangsmaterial neben embryonalem Hühnerknorpel homogenisierte Ratten-Chondrosarkomzellen. Durch die Kombination von Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltrations-Chromatographie an Sephadex G-200 und Affinitätschromatographie an immobilisierten deglykosylierten Knorpelproteoglykanen beschreiben Schwartz *et al.* die Reinigung der XT bis zur elektrophoretischen und immunologischen Homogenität. Aus 600 Hühnerembryonen wurden demnach bei einer Gesamtausbeute von 35 % und einem 4100fachen Aufreinigungsfaktor 200 - 400 µg XT gewonnen. In einem ähnlichen Reinigungsverfahren, bei dem lediglich auf die Ammoniumsulfatfällung verzichtet wurde, wird auch die Isolierung der XT aus Ratten-Chondrosarkomzellen beschrieben. Die Gesamtausbeute wird bei einem Aufreinigungsfaktor von 630 mit 40 % angegeben.

Die aus embryonalem Hühnerknorpel und die aus Ratten-Chondrosarkomzellen gereinigte XT zeigten ähnliche physikalische Eigenschaften [68, 69]. Für beide Enzyme wurde mittels Gelfiltration an Sephadex G-100 ein Molekulargewicht von 95.000 - 100.000 Da bestimmt. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zeigten beide Enzyme eine einzelne mit Coomassie-Blau gefärbte Bande. Nach der Behandlung der Enzyme mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol erschienen in beiden Fällen in der PAGE zwei diffuse Banden mit einem Molekulargewicht von 23.000 Da und 27.000 Da. Danach sollte sich das native Enzym aus beiden Geweben aus zwei Paaren von nicht identischen Untereinheiten aufbauen. Da sich beim Einsatz von Ratten-Antiserum gegen die aufgereinigte XT aus Hühnerknorpel sowohl bei der Ochterlony-Doppeldiffusions-Technik als auch bei der Immunelektrophorese nur eine einzige Immunpräzipitationslinie zeigte, sollte das Enzym homogen sein. Allerdings wurden von keiner gereinigten XT Sequenzdaten angegeben.

Bei der XT aus Hühnerknorpel und aus Ratten-Chondrosarkomzellen wurden zwar die gleichen Kohlenhydratanteile von etwa 10 % bestimmt, aber eine unterschiedliche Kohlenhydratzusammensetzung ermittelt. Außerdem konnte keine Kreuzreaktion zwischen dem Antiserum der gereinigten XT aus Hühnerknorpel und der XT aus Ratten-Chondrosarkomzellen beobachtet werden. Demnach sollten sich die beiden Enzyme strukturell unterscheiden. Andererseits benötigen beide Proteine ein bivalentes Metallkation für ihre enzymatische Aktivität, wobei Mangan wirksamer ist als Magnesium. Unter Standardbedingungen zeigten beide Enzyme eine ähnlich hohe spezifische Aktivität. Der  $K_m$ -Wert bezüglich des XT-Akzeptorsubstrats für die aus Hühnerknorpel gereinigte XT betrug hierbei  $0,0022 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und für die aus Ratten-Chondrosarkomzellen gereinigte XT  $0,0025 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

---

Eine XT-Mangelmutante konnte bis heute nicht nachgewiesen bzw. erzeugt werden. Das liegt offensichtlich daran, daß die Funktion vieler essentieller Proteine von ihrer Glykosylierung abhängt, so daß eine solche Mutation wahrscheinlich schon in ihrer fötalen Entwicklung letal ist. Allerdings konnte durch den Einsatz mutagener Reagenzien bei einer Hamsteroovarien-Zelllinie ein Klon erzeugt werden, der eine verminderte XT-Syntheserate zeigte [70].

### 3. Aufgabenstellung

Die Aminosäuresequenz der XT, die Struktur des Enzyms und das Gen, das für die Sequenz der XT codiert, sind bis heute völlig unbekannt. Aus diesem Grund ist die Bestimmung erster Sequenzinformationen der XT von zentraler Bedeutung, da Teilsequenzen des Proteins Informationen zur Synthese von Oligonucleotiden liefern, die zur Klonierung des Proteins notwendig sind. Die Teilsequenzen der XT bilden sowohl die Grundlage für die Bestimmung des XT-Gens als auch die Basis für die rekombinante Herstellung des Proteins.

Im Rahmen der Dissertation sollte die humane XT isoliert und das gereinigte Enzym zur Bestimmung erster Sequenzinformationen eingesetzt werden.

Als Basis für eine erfolgreiche Isolierung des Enzyms mußten die folgenden Aufgaben gelöst werden:

1. Es mußte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem eine zur Isolierung der XT ausreichend große Menge des Enzyms in möglichst reiner Form erzeugt werden kann.
2. Es sollte eine Methode gefunden werden, die es erlaubt, das Enzym in biologisch aktiver Form ohne größere Verluste reproduzierbar anzureichern.
3. Die Proteinaufreinigungsschritte mußten so kombiniert und optimiert werden, daß eine zur Sequenzierung notwendige Proteinmenge des Enzyms in ausreichender Reinheit isoliert werden kann.

Nach erfolgreicher Isolierung sollte die XT entweder N-terminal ansequenziert oder bei blockiertem N-Terminus in einzelne Peptide gespalten werden. Danach sollte die Sequenzierung der aufgetrennten Peptide Teilsequenzen der XT liefern.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolierung der Xylosyltransferase

Die Isolierung der XT ist nicht nur Grundlage für die Charakterisierung des Enzyms, sondern auch die Basis für die Klonierung und rekombinante Expression des Proteins. Ein systematischer Weg zur Isolierung eines Enzyms bilden die fünf grundlegenden Schritte einer Proteinreinigung [71]:

1. Entwicklung eines spezifischen Aktivitätstests
2. Wahl eines geeigneten Ausgangsmaterials, aus dem das Protein isoliert werden kann
3. Lösen des Proteins
4. Stabilisierung des Proteins bei jedem Konzentrierungs- und Reinigungsschritt
5. Entwicklung von Konzentrierungs- und Isolierungsschritten.

#### 4.1.1 Xylosyltransferase-Aktivitätstest

Im XT-Aktivitätstest wird der Xylosetransfer von UDP-[<sup>14</sup>C]Xylose auf einen spezifischen Akzeptor gemessen. Mit einer neuen Bikunin-Variante als Akzeptorprotein kann die enzymatische Aktivität der XT mit hoher Präzision und Sensitivität bestimmt werden [65].

##### 4.1.1.1 Substratspezifität der Xylosyltransferase

Spezifische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat basieren auf der molekularen Substraterkennung. Die hohe Substratspezifität der XT hinsichtlich des Xyloseakzeptors zeigte sich im Rahmen der Ermittlung der Consensus-Sequenz a-a-a-a-G-S-G-a-b-a, mit a = E oder D und b = G, E, oder D, beim Vergleich verschiedener XT-Akzeptorsubstraten [65]. Auf der Grundlage dieser Sequenz wurden weitere potentielle Xyloseakzeptoren getestet. Als moderater Akzeptor wurde ein Fragment des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (*Fibroblast growth factor* (bFGF)) mit einer Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von 25  $\mu$ M gefunden.

Um die entscheidenden Strukturmerkmale bei der Substraterkennung der XT hinsichtlich des Xylosedonators herauszufinden, wurden neben der radioaktiv markierten UDP-Xylose Verbindungen ähnlicher Struktur dem XT-Test als potentielle kompetitive Inhibitoren im

Überschuß zugesetzt. Die im Test eingesetzte Konzentration an radioaktiv markierter UDP-Xylose betrug 1  $\mu\text{M}$ , die der potentiellen Inhibitoren dagegen 2,5 mM.

Eine Teilstruktur der UDP-Xylose, das Nucleosid Uridin, hatte hierbei nur einen sehr geringen Einfluß auf die XT-Aktivität. War dagegen die 5'OH-Gruppe der Ribose des Uridins mit Phosphorsäure verestert (UMP), wurde die XT-Aktivität deutlich inhibiert. Das Nucleotid UDP, das eine Diphosphatgruppe am C-5 des Uridins trägt, führt zur fast vollkommenen Inhibierung der XT. Nur das nicht radioaktiv markierte Substrat der XT, die UDP-Xylose selbst, zeigt bei den Untersuchungen eine noch niedrigere Einbaurate von radioaktiv markierter Xylose in den Xyloseakzeptor der XT. Eine Triphosphatgruppe am C-5 des Uridins erschwerte offensichtlich wieder die Erkennung der XT für den Xylosedonator, da die hierbei gemessene inhibitorische Wirkung im Vergleich zu UDP geringer war.

Die Bedeutung der Pyrimidinbase des Nucleotids für die Substraterkennung der XT zeigte sich, als das Nucleotid CDP als potentieller Inhibitor im Test eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu UDP wurde durch CDP die XT-Aktivität nur wenig inhibiert. Entscheidend für die Erkennung ist offensichtlich auch der Zucker, der an UDP gebunden ist. Denn im Vergleich zu nichtradioaktiv markierter UDP-Xylose zeigte beispielsweise UDP-Galactose nur eine geringe inhibitorische Wirkung im Testansatz (Tab. 1).

Neben der Pyrimidinbase Uridin, der Diphosphatgruppe und dem Zucker Xylose enthält die UDP-Xylose als Strukturmerkmal noch den Ribosering. Die Rolle dieses Furanoserings bei der Wechselwirkung mit der XT wurde im Rahmen einer oxidativen Periodatspaltung des Rings untersucht. Die hierbei gebildeten Dialdehyde des UDP und der UDP-Xylose wirkten nur noch als moderate Inhibitoren der XT. Daraus läßt sich folgern, daß auch der Ribosering der UDP-Xylose für die Erkennung des Moleküls durch die XT von entscheidender Bedeutung ist.

Im Vergleich zu der in der Literatur [72] angegebenen relativ starken inhibitorischen Wirkung der Dialdehyde von Uridin (47% Inhibition) und Cydidin (65% Inhibition) auf die XT-Aktivität konnte hier nur eine moderate Inhibition dieser Dialdehydnucleoside gemessen werden. Dagegen bestätigte sich die in der Literatur angegebene stark inaktivierende Wirkung des Pyridoxalphosphats (86% Inhibition) auf die XT-Aktivität [72].



Potentieller kompetitiver XT-Inhibitor	Inhibitor [%]	Inhibition nach Periodatbehandlung [%]
Uridin	3,8	21,9
UMP	63,3	44,3
UDP	99,2	59,1
UTP	96,4	68,7
UDP-Xylose	99,6	69,2
UDP-Galactose	30,0	27,8
Cytidin	0,9	31,6
CDP	39,8	66,4
Ribose	0,3	0,1
Pyridoxalphosphat	90,1	n.g.

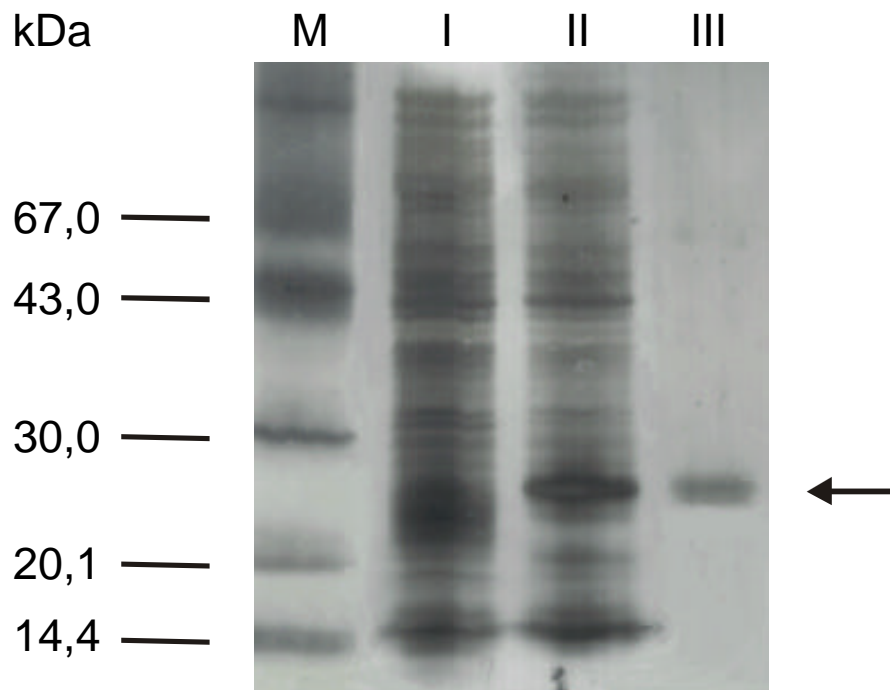
**Tab. 1** Prozentuale Inhibition der XT-Aktivität durch nichtradioaktive UDP-Xylose, dem Xylosedonator der XT, bzw. durch strukturell verwandte chemische Verbindungen und durch Pyridoxalphosphat (n.g. = nicht gemessen).

#### 4.1.1.2 Darstellung von rekombinantem Bikunin bzw. $[V^{36}, V^{38}, \delta^1], [G^{92}, I^{94}, \delta^2]$ Bikunin

Als ideale Akzeptorsubstrate für die XT wurden Bikunin und  $[V^{36}, V^{38}, \delta^1], [G^{92}, I^{94}, \delta^2]$  Bikunin nachgewiesen. Die Proteine wurden in *E. coli* rekombinant hergestellt. Dazu wurden Klone des Bakterienstammes BL21 (DE3) [Genotyp: *E. coli* B F,  $Omp^+$  T,  $R_B^-$ ,  $M_B^-$ , DE3], die jeweils die codierende DNA-Sequenz für eines der beiden Proteine in einem pET 15 b Expressionsvektor trugen, eingesetzt. Pro 750 ml Ansatz ergab sich hierbei nach der Induktion der Proteinexpression durch IPTG ein Bakteriensediment von 0,6 g, in dem das Expressionsprodukt in Form von *Inclusion bodies* angereichert vorlag. Nach der Suspension des Bakteriensediments, der Lyse der Bakterien und dem Lösen der gesamten Zellmasse in denaturierendem Puffer, der Abzentrifugation unlöslicher Partikel und der Dialyse des Zelllysats zur Entfernung der denaturierenden Reagenzien lag das rekombinante Protein als Rohprodukt in einer Konzentration von 0,15 mg/ml in 200 ml Dialysat vor.

Wegen der N-terminalen Histidin-*Leader*sequenz der rekombinanten Proteine konnte eine Affinitätschromatographie an einer  $Ni^{2+}$ -chelatisierenden Matrix durchgeführt werden. Hierbei konnte das Rohprodukt etwa um den Faktor 4 aufgereinigt werden. Nach der anschließenden Dialyse und einer zweiten Chromatographie des grob gereinigten Proteins an der gleichen Matrix wurde das rekombinante Protein in ca. 95 %iger Reinheit gewonnen (Abb. 4). Die Ausbeute betrug pro 750 ml Ansatz ca. 6,4 mg gereinigtes, rekombinantes

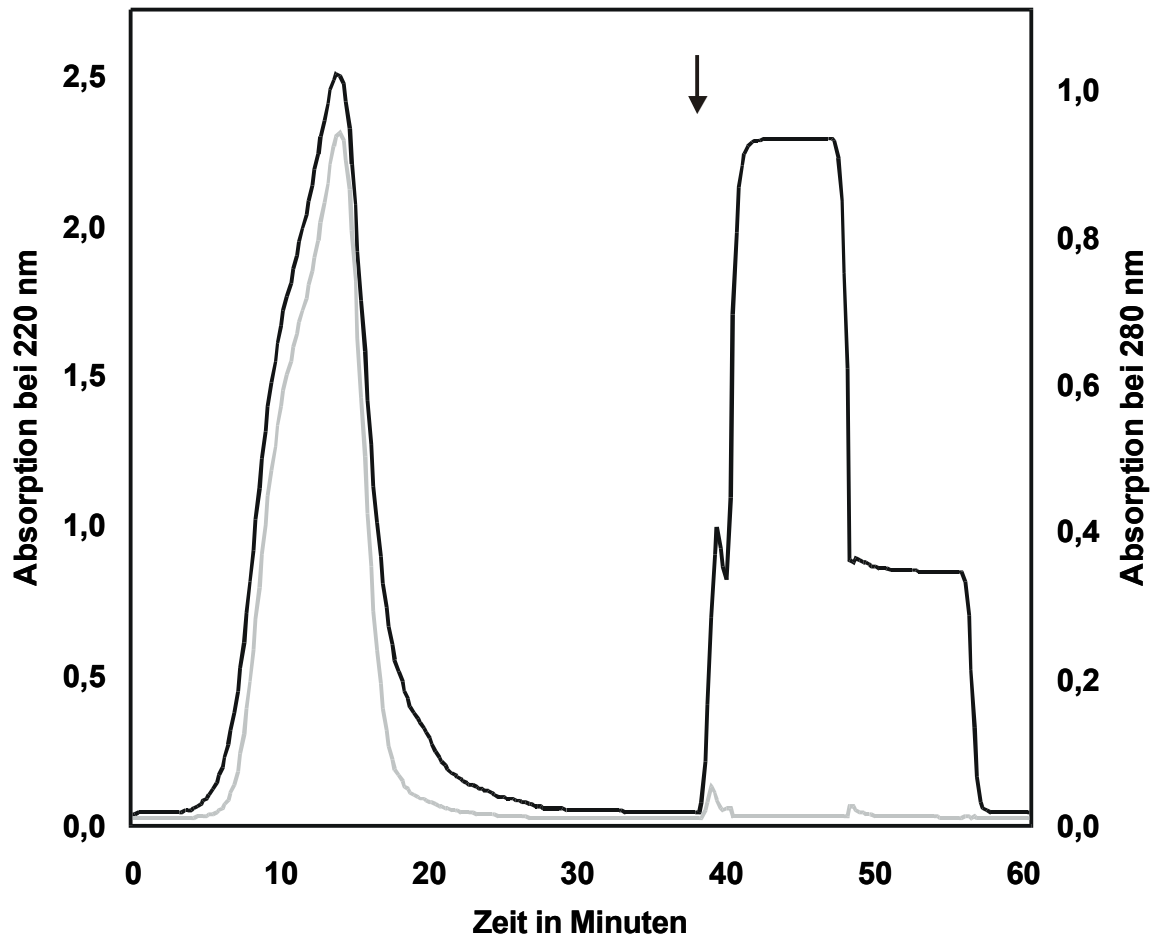
Protein. Sowohl die Expressionsraten als auch die Effektivität der Aufreinigung waren für Bikunin und  $[V^{36}, V^{38}, \delta^{81}], [G^{92}, I^{94}, \delta^{82}]$  Bikunin gleich.



**Abb. 4** SDS-Polyacrylamidgel des Bakterienlysats bzw. des gereinigten rekombinanten Bikunins. Das silbergefärbte Gel zeigt neben dem Massenstandard (M) die Proteine des Bakterienlysats vor der Expressionsinduktion (I), nach der Expressions-induktion (II) und nach der Affinitätschromatographie an einer  $Ni^{2+}$ -chelatisierten Matrix (III). Der Pfeil zeigt das gereinigte Bikunin.

#### 4.1.1.3 Charakterisierung des XT-Reaktionsprodukts

Zur Untersuchung der XT-katalysierten Reaktion wurden 0,1 mg des biotinylierten Peptidsubstrats Biot-QEEEGSGGGQKK-amid mit nichtradioaktiv markierter UDP-Xylose mit einer partiell aufgereinigten stark angereicherten XT-Präparation zu etwa 80 % umgesetzt. Die biotinylierten Edukte und biotinylierten Produkte der Reaktion wurden durch Chromatographie an immobilisiertem monomerem Avidin von kontaminierenden Substanzen abgetrennt. Abb. 5 zeigt den durch die Absorption (220 nm) des spezifischen Elutionsmittels D-Biotin teilweise überlagerten Elutionspeak. Bei einer Absorption von 280 nm werden nur die biotinylierten Polypeptide im Eluat detektiert.

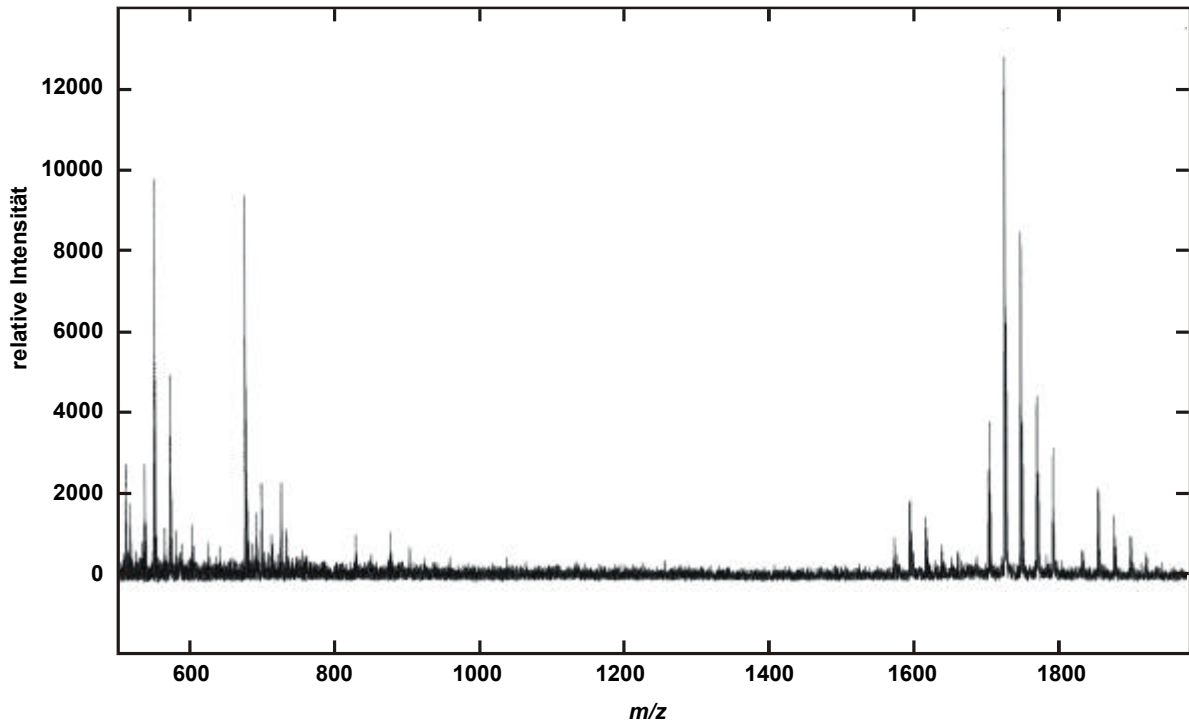


**Abb. 5** Elutionsprofil der Affinitätschromatographie an immobilisiertem monomeren Avidin. Biotinylierte Moleküle werden an der Avidinmatrix durch kompetitive Elution mit D-Biotin abgetrennt. Der Pfeil zeigt den Beginn der Elution durch D-Biotin. Die UV-Absorption bei 220 nm (  $\%$  ) zeigt die Überlagerung des D-Biotinpeaks mit dem Peak der eluierten biotinylierten Moleküle. Bei 280 nm (  $\%$  ) werden im Eluat nur die biotinylierten Polypeptide detektiert.

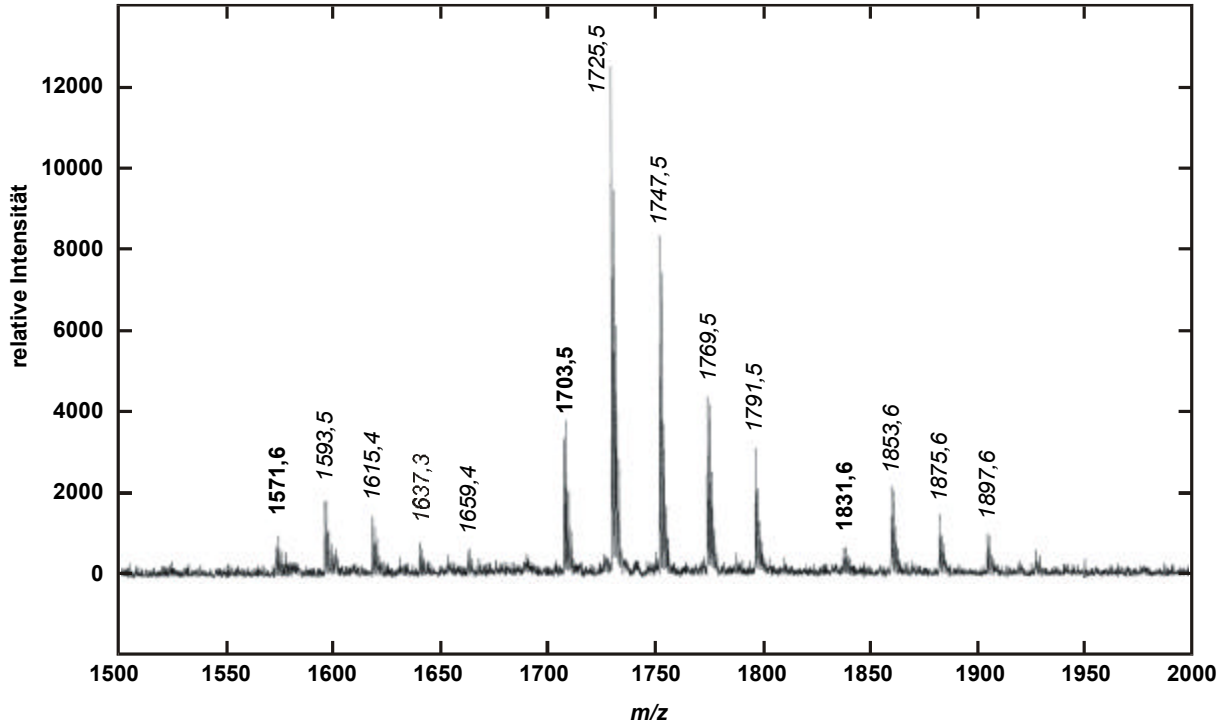
Das Eluat wurde lyophilisiert und anschließend in 100  $\mu$ l 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Ein Aliquot dieser Probe wurde mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix für die MALDI-MS präpariert.

Das MALDI-Spektrum der Probe (Abb. 6) zeigt die meisten Massensignale als protonierte Moleküle  $MH^+$ . Die Probe zeigt vor allem die Signale 1571, 1703 und 1831 sowie deren Na-Addukte mit einem Massenabstand von 22 (Abb. 6 und Abb. 7). Das Signal 1571 entspricht der Masse des protonierten Edukts. Da Xylose ein Molekulargewicht von 150 Da hat, ergibt sich nach Abspaltung des Wassers (18 Da) für das protonierte xylosylierte Peptid eine Molekularmasse von 1703 Da. Das Signal 1831 lässt sich durch die XT-katalysierte Reaktion nicht erklären.

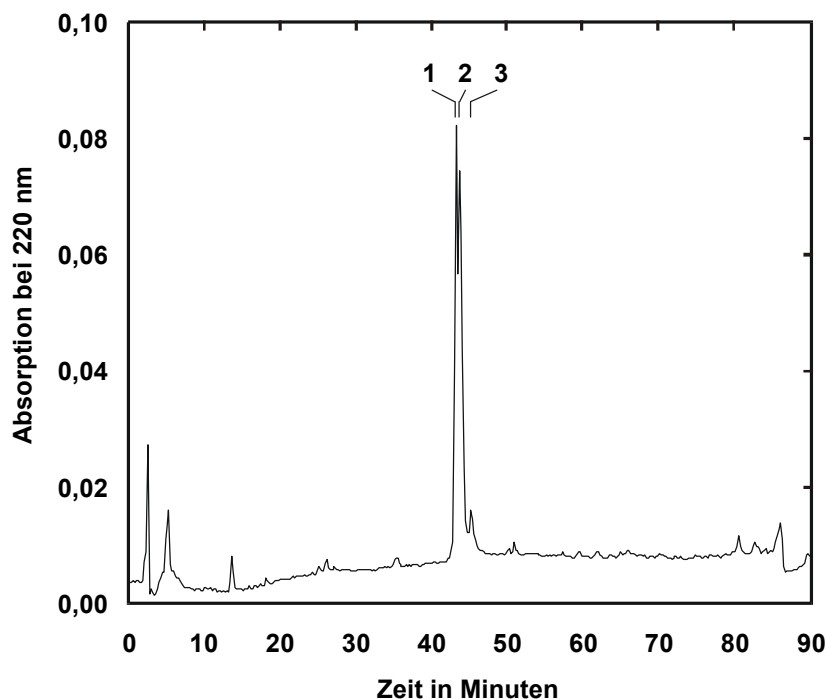
Die im Eluat der Avidin-Chromatographie enthaltenen Substanzen konnten durch RP-HPLC in drei partiell getrennte Peaks aufgetrennt werden (Abb. 8).



**Abb. 6** MALDI-TOF-Spektrum des Eluats der Avidin-Chromatographie. Die meisten Massensignale sind protonierte Molekülonen  $MH^+$  bzw. deren Na-Addukte. Bei sauren Molekülen oder Salzen aus Puffern erhält man auch die entsprechenden Kationen-Addukte der Molekülonen.



**Abb. 7** Ausschnitt des relevanten Bereiches des MALDI-TOF-Spektrums (Abb. 6). Das Spektrum wurde extern kalibriert, so daß die Massen mit einer Genauigkeit von ca. 0,2 Da angegeben sind. In der Probe zeigen sich vor allem die Signale **1571** (protoniertes Peptid), **1703** (protoniertes, xylosyliertes Peptid) und **1831** (unbekanntes Produkt) sowie mehrere Na-Addukte dieser Signale mit einem Massenabstand von 22.



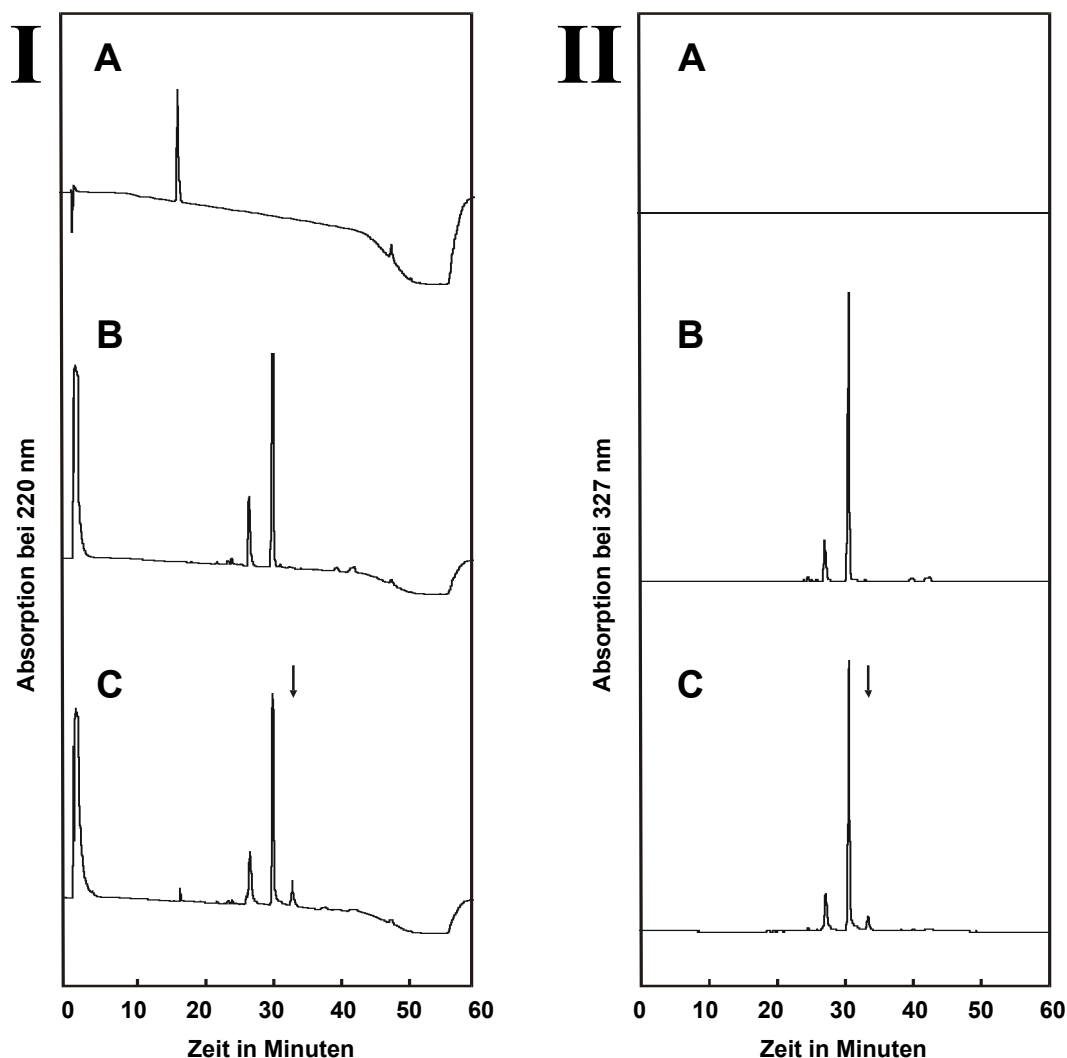
**Abb. 8** Elutionsprofil der Auftrennung des Avidin-Chromatographie-Eluats. Die im Eluat enthaltenen Verbindungen konnten durch RP-HPLC an einer Pepmap C18-Säule (5  $\mu$ m; 2,1 x 100 mm) in drei partiell getrennte Peaks aufgetrennt werden. Zur Analyse wurden 20  $\mu$ l Probe aufgegeben. Die Auftrennung der Probe erfolgte über einen linearen Wasser + 0,1 % TFA/Acetonitril-Gradienten (100/0 V/V auf 0/100 V/V in 90 min) mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min bei RT.

#### 4.1.1.4 Chemische Modifikation als Mittel zur Einführung von Reportergruppen

Die chemische Modifikation von Proteinen dient in der Enzymologie unterschiedlichen Zwecken. Sie bietet die Möglichkeit der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen und der Bestimmung von Raumstrukturen. Bei der Affinitätsmodifikation, einem Sonderfall der chemischen Modifikation, enthält das modifizierende Reagenz eine reaktive Gruppe und eine Struktur, die eine hohe Affinität für das aktive Zentrum eines Enzyms besitzt. Mit dieser Methode kann ein Bindungsprotein selektiv und kovalent markiert werden, ohne daß es zuvor gereinigt werden muß.

Isolierungs- und Reinigungsschritte der XT sind bis heute auf native Methoden beschränkt, da die XT bis jetzt nur über ihre enzymatische Aktivität detektiert werden kann. Durch die Fluoreszenzmarkierung der XT kann das Spektrum der Methoden um denaturierende Reinigungsschritte erweitert werden. Mit Hilfe der Affinitätsmodifikation wurde deshalb versucht, eine fluoreszierende Gruppe in die XT einzubauen. Zur Fluoreszenzmarkierung des Enzyms wurde zunächst eine lichtaktivierbare Gruppe mit Hilfe des heterobifunk-

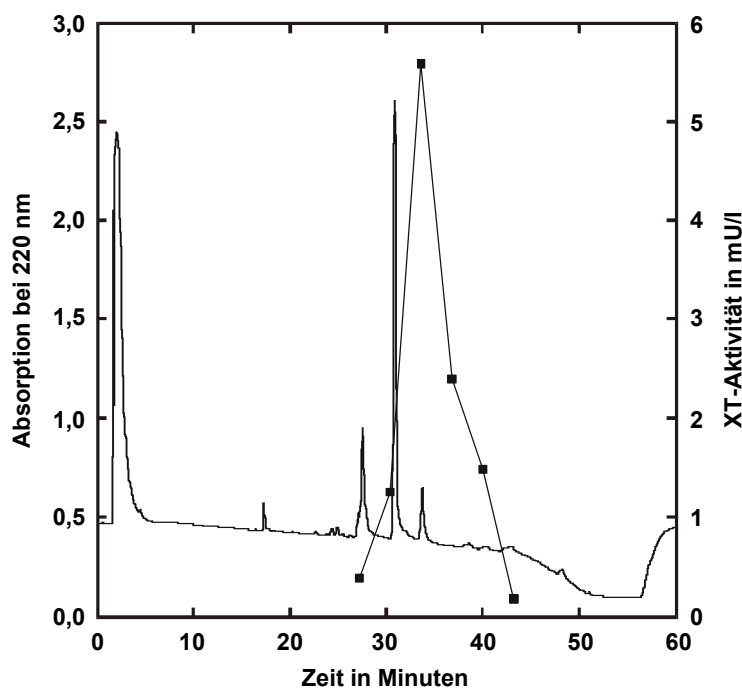
tionellen, aminreaktiven, wasserlöslichen, photoreaktiven Vernetzers Sulfosuccinimidyl 2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-acetamido) ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAED) in das biotinylierte Xylosyltransferase-Substrat Biot-QEEEGSGGGQKK-amid eingeführt (siehe 6.9.2, Gl. 4).



**Abb. 9** Abtrennung des photoaktivierbaren Xylosyltransferase-Substrats durch RP-HPLC. Die RP-HPLC wurde an einer Pepmap C18-Säule (5  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 100 mm) mit 0,1 % TFA als Laufmittel durchgeführt. Die Auftrennung der Probe erfolgte jeweils durch einen linearen Wasser + 0,1 % TFA/Acetonitril-Gradienten 0-50 (V/V) über 40 Minuten bei einer Flußrate von 0,2 ml/min. **(A)** Retentionszeit des Peptids Biot-QEEEGSGGGQKK-amid (Edukt 1). Die Messung bei 220 nm **(I)** basiert vorwiegend auf den Absorptionseigenschaften der Peptidbindungen des Peptids. Für 327 nm **(II)** besitzt das Peptid keine chromophore Gruppe und kann deshalb nicht detektiert werden. **(B)** Retentionszeit des SAED-Crosslinker (Edukt 2). Das SAED ist offensichtlich teilweise hydrolysiert, da drei Peaks bei 220 nm **(I)** und zwei Peaks bei 327 nm **(II)** detektiert werden. Der zusätzliche Peak bei 220 nm **(I)** stammt vom DMSO. **(C)** Chromatogramm der Reaktionsprodukte. Das Peptid ist fast vollständig umgesetzt (sehr kleiner Peptidpeak). Der Pfeil zeigt das gebildete Syntheseprodukt.

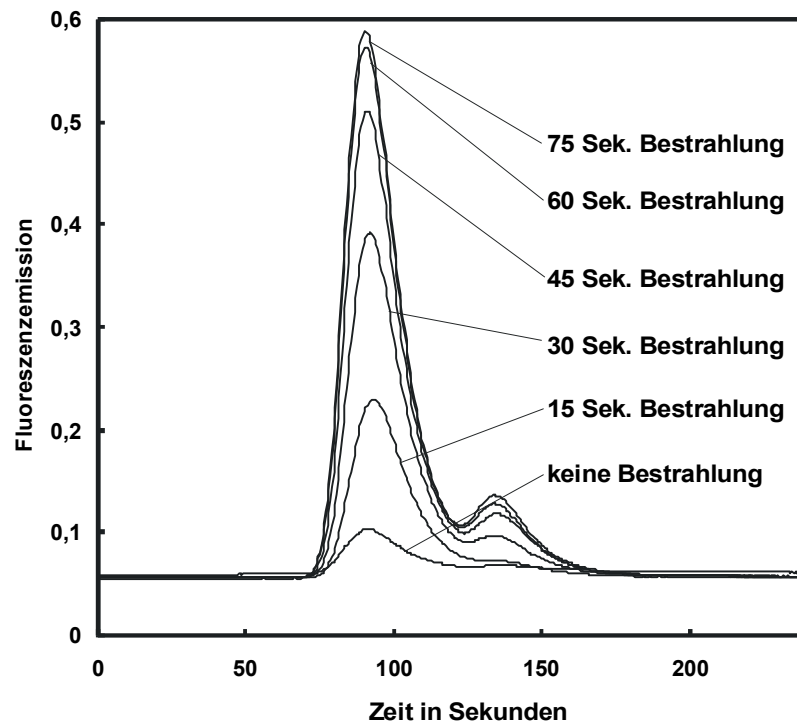
Nach der Reaktion erfolgte die Auftrennung der Reaktionsprodukte durch RPC. Hierbei erwies sich ein linearer Wasser + 0,1 % TFA/Acetonitril-Gradient (100/0 V/V auf 50/50 V/V) in 40 min an einer Pepmap C18-Säule, 5  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 100 mm bei einer Flußrate von 0,2 ml/min

als ideal. Analog dazu wurde, zum Vergleich, die RPC auf die Edukte der Reaktion angewandt. Das Peptid konnte hierbei als homogener Peak bei 220 nm detektiert werden (Abb. 9 I A). Bei 327 nm wurde dagegen erwartungsgemäß kein Peak detektiert (Abb. 9 II A), da das Peptid keine chromophore Gruppe besitzt, die bei dieser Wellenlänge absorbiert. Infolge des TFA-Gehaltes des Laufmittels war das SAED offensichtlich teilweise hydrolysiert, so daß zwei Produkte bei 327 nm detektiert wurden (Abb. 9 II B). Bei 220 nm wurde hierbei zusätzlich das DMSO detektiert (Abb. 9 II A). Erwartungsgemäß wurde das Peptid bei der Reaktion mit SAED quantitativ umgesetzt und war nach der Reaktion nur noch in Spuren vorhanden (Abb. 9 I C, sehr kleiner Peak). Das Syntheseprodukt hatte im Vergleich zu den Edukten die längste Retentionszeit bei der RPC (Abb. 9 C, Pfeil). Nach dem Abdampfen des Acetonitril/Wasser/TFA-Gemisches im Vakuum konnte das Syntheseprodukt im XT-Test als geeignetes Substrat eingesetzt werden (Abb. 10).



**Abb. 10** Darstellung der RP-HPLC-Auftrennung der Peptid-SAED-Reaktionsprodukte. Die Reaktionsprodukte wurden an einer Pepmap C18-Säule aufgetrennt (siehe Abb. 9) und 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Das Acetonitril/Wasser/TFA-Gemisch einzelner Fraktionen wurde abgedampft und der jeweilige Rückstand als XT-Akzeptor-Substrat im XT-Test eingesetzt. (—) Absorption bei 220 nm; ■ ■ XT-Aktivität der gemessenen Proben.

Zur Bestimmung der optimalen Bestrahlungsdauer für die Photoreaktion wurde der *Crosslinker* SAED eingesetzt. Bereits vor der UV-Bestrahlung zeigte SAED eine schwache Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die durch UV-Licht der Wellenlänge 365 nm initiierte Photolyse-reaktion, Fluoreszenzzunahme infolge der Abspaltung der Azidgruppe von der AMAC-Funktion des SAED, war nach etwa 60 s abgeschlossen (Abb. 11).



**Abb. 11** Zeitlicher Verlauf der Photolysereaktion des SAED-Vernetzers, aufgezeichnet als Emissionsspektrum des Moleküls. Der Vernetzer wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Nach jeweils 15 Sekunden Bestrahlung wurde ein Aliquot auf eine Pepmap C18-Säule (5  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 100 mm) gegeben, mit Acetonitril/Wasser (15/2, V/V) bei einer Flußrate von 0,2 ml/min eluiert und die Fluoreszenz des Eluats bei 450 nm detektiert. Die in der Abbildung übereinandergelegten Spektren zeigen die Fluoreszenzzunahme infolge der Abspaltung der Azidgruppe von der AMAC-Funktion des SAED-Vernetzers. Nach 60 Sekunden ist praktisch keine Fluoreszenzzunahme mehr meßbar. Die Azidgruppe der AMAC-Funktion des SAED ist offensichtlich quantitativ abgespalten.

In einem weiteren Schritt erfolgt der Einbau der fluoreszierende Gruppe des photoaktivierbaren SAED-Xylosyltransferase-Substrats in die XT (siehe 6.9.3, Gl. 5). Nach der Photoreaktion wurden im Überstand der Reaktionslösung noch 39 % der ursprünglich eingesetzten XT-Aktivität gemessen. Mit Hilfe der Biotinfunktion wurde das Reaktionsprodukt an monomerem Avidin spezifisch von Verunreinigungen abgetrennt. Hierbei wurden 5,4 % der aufgegebenen XT-Aktivität im Biotin-Eluat wiedergefunden.

#### 4.1.2 Wahl und Produktion des Ausgangsmaterials zur Aufreinigung der XT

Für die Aufreinigung der XT wurde bisher meist Knorpelsubstanz als Ausgangsmaterial benutzt, in der eine im Vergleich zu anderen tierischen Geweben relativ große Menge des aktiven Enzyms enthalten ist. Durch den Aufschluß des Knorpels werden allerdings viele kontaminierende Proteine und Glykosaminoglykane freigesetzt, die die nachfolgende Aufreinigung der XT stören. Eine sinnvolle Alternative zum organischen Gewebe als Ausgangsmaterial zur Isolierung des Enzyms ist daher die Produktion von XT-haltigem



Zellkulturüberstand. Zu diesem Zweck wurden in erster Linie Zellen, die am Aufbau des Bindegewebes beteiligt sind, kultiviert und ihr Zellkulturüberstand auf XT-Aktivität getestet (Tab. 2). Um ein hinsichtlich der XT möglichst reines Ausgangsprodukt zu erhalten, wurden die Zellen von serumhaltiger Kultivierung in serumfreie überführt.

#### 4.1.2.1 XT-Bildungsrate diverser Zelllinien

Adhärente Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Die Probenentnahme für die XT-Aktivitätsmessung erfolgte aus dem Überstand des verbrauchten Kulturmediums nach dem Abzentrifugieren von Zellen und Zelltrümmern. Bei Suspensionskulturen erfolgte die Probenentnahme aus dem verbrauchten Kulturmedium bei einer Zelldichte von etwa  $2 \times 10^5$  Zellen/ml. Zellen und Zelltrümmer wurden vor der XT-Aktivitätsbestimmung durch Zentrifugation entfernt. Die gemessenen XT-Aktivitäten der Überstände der verschiedenen Zelllinien sind in Tab. 2 aufgeführt.

Zelllinie	Zellkulturmedium	XT-Aktivität des ZKÜ [mU/l]	Anzahl der Mes- sungen	Standardab- weichung
JAR	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,97	5	0,15
JAR	Hybridoma-Medium	0,23	5	0,04
JAR	Ultradoma-Medium PF	0,22	2	0,02
SW 1353	Medium 199 + 10 % FCS	0,93	2	0,09
SW 1353	Hybridoma-Medium PF	0,49	2	0,04
SAOS-2	Medium 199 + 10 % FCS	0,16	2	0,01
SAOS-2	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,12	2	0,01
SW 982	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,09	1	-
Y 79	RPMI 1640 + 20 % FCS	0,10	4	0,03
Y 79	Ultradoma-Medium PF	0,05	2	0,00
BM-1604	RPMI 1640 + 20 % FCS	0,03	4	0,00
WERI-RB-1	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,03	4	0,01
A-431	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,02	2	0,01
RPMI 2650	Medium 199 + 10 % FCS	0,01	4	0,00
MHH-ES-1	RPMI 1640 + 10 % FCS	0,01	4	0,00

**Tab. 2** Übersicht der XT-Aktivität im Überstand diverser Zelllinien. Die serumfreie Kultivierung der Zellen ist grau unterlegt.

Von den gemessenen Zelllinien zeigten JAR-Choriokarzinom-Zellen, kultiviert in RPMI 1640 mit 10 % FCS, die höchste Aktivität mit 0,97 mU/l. Eine vergleichbar hohe XT-Aktivität von 0,93 mU/l konnte nur noch im Überstand der Chondrosarkom-Zelllinie SW 1353 gemessen werden. Die Zellen wurden hierbei in Medium 199 mit 10 % FCS kultiviert. Bei serum- und proteinfreier Kultivierung zeigte der Überstand der SW 1353-Zellen eine etwa doppelt so hohe XT-Aktivität als der der JAR-Zellen. Da aber die Chondrosarkom-Zellen der SW 1353 -Zelllinie streng adhärent wachsen und langsamer proliferieren als JAR-Choriokarzinom-Zellen, sind sie für ein Scale-up der XT-Produktion weniger geeignet als JAR-Zellen. Bei der Zelllinie SAOS-2 blieb eine serumfreie Kultivierung erfolglos.

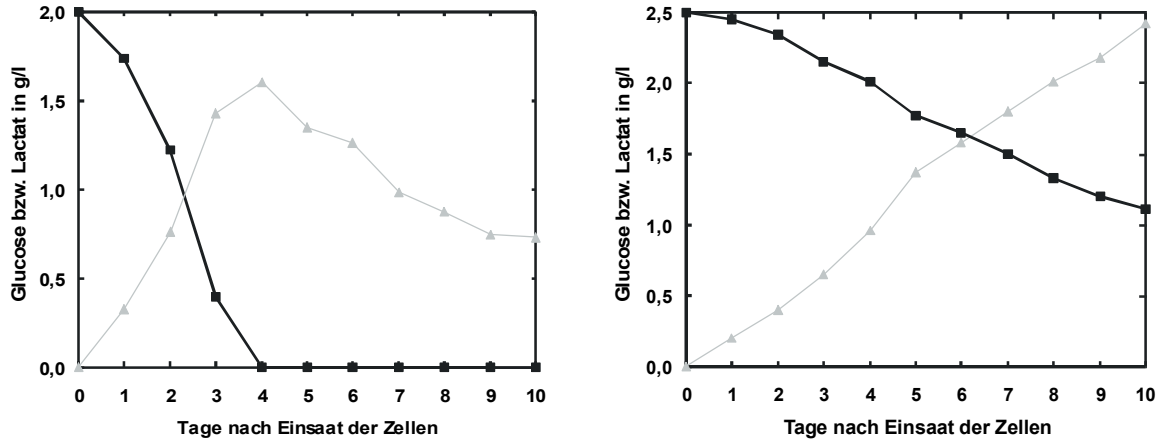
Da der Kulturüberstand der Zelllinien SW 982, BM-1604, WERI-RB-1, A-431, RPMI 2650 und MHH-ES-1 schon bei serumhaltiger Kultivierung der Zellen eine sehr geringe XT-Aktivität zeigte, wurde auf eine Überführung der Zellen in serumfreies Medium verzichtet.

#### **4.1.2.2 JAR-Zellen in einem serumhaltigen bzw. serumfreien Zellkulturmedium**

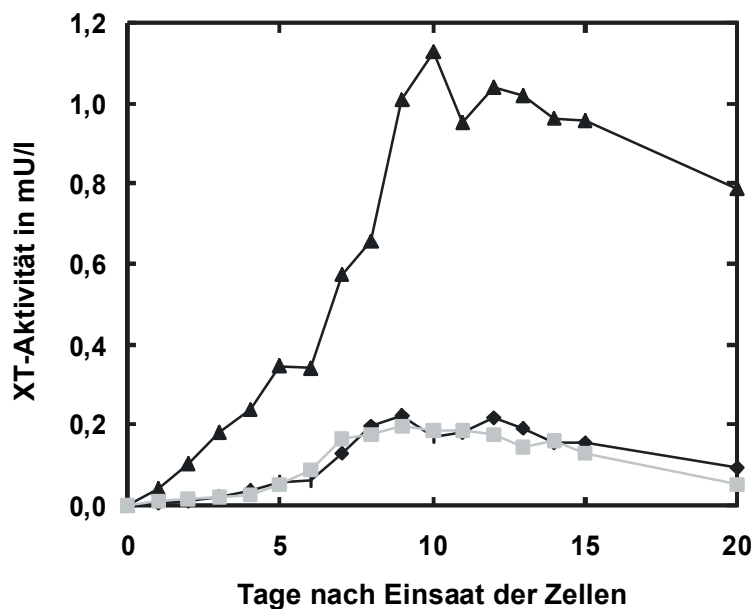
Bei der Kultivierung der JAR-Zellen in RPMI 1640 mit 10 % FCS waren die Zellen bei einer Einsaatdichte von  $10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  nach 4 bis 5 Tagen konfluent gewachsen. Die im Medium vorhandene Glucose war nach 4 Tagen verstoffwechselt, gleichzeitig erreichte die Lactatkonzentration ein Maximum (Abb. 12). Interessanterweise wurde das Maximum der Xylosyltransferase-Aktivität im Zellkulturüberstand aber erst nach 10 Tagen erreicht, nachdem das Absterben der Zellen bereits begonnen hatte (Abb. 13). Der Proteingehalt des Mediums betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 6,4 mg/ml.

Die JAR-Zellen im serum- und proteinfreien Hybridoma-Medium wuchsen dagegen oft nur subkonfluent und waren teilweise übereinandergeschichtet. Entsprechend ihrem langsameren Wachstum war auch die Stoffwechselrate, gemessen am Glucoseverbrauch bzw. an der Lactatbildung der JAR-Zellen im Hybridoma-Medium, ohne FCS geringer (Abb. 12). Das Maximum der Xylosyltransferase-Aktivität war zwar schon nach 9 Tagen erreicht, betrug aber nur etwa 20 % des Maximums der FCS-haltigen Kultivierung der Zellen (Abb. 13). Da aber das Zellkulturmedium zu diesem Zeitpunkt nur 0,08 mg/ml Protein enthielt, war die spezifische Xylosyltransferase-Aktivität mit 2,8 mU pro Gramm Protein gegenüber der spezifischen Xylosyltransferase-Aktivität von 0,15 mU/g, die nach 10 Tagen serumhaltiger Kultivierung der JAR-Zellen erreicht wurde, etwa 19mal höher (Abb. 16).

Durch den Zusatz von 10 µg/ml Insulin und 10 µg/ml Transferrin im serum- und proteinfreien Hybridoma-Medium konnte keine nachweisliche Steigerung der XT-Bildungsrate erreicht werden (Abb. 13).



**Abb. 12** Darstellung des Glucoseverbrauchs bzw. des Lactatanstiegs im Zellkulturüberstand während der Kultivierung von JAR-Choriokarzinom-Zellen. Linke Abb.: Kultivierung der Zellen in RPMI 1640 mit 10 % FCS. Rechte Abb.: Kultivierung der Zellen im serum- und proteinfreien Hybridoma-Medium. ■ ■ Glucosekonzentration ▲ ▲ Lactatgehalt.

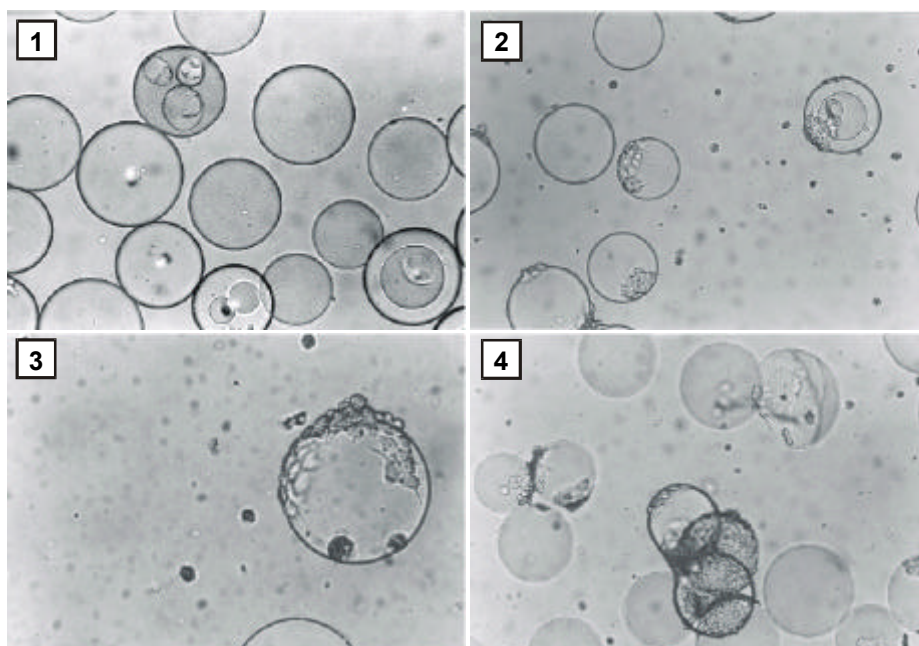


**Abb. 13** Vergleich der XT-Bildungsrate von JAR-Choriokarzinom-Zellen bei serumfreier Kultivierung in Hybridoma-Medium und bei gleichen Bedingungen, aber unter Zusatz von 10 µg/ml Insulin sowie 10 µg/ml Transferrin bzw. bei serumhaltiger Kultivierung in RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FCS. ◆ ◆ Proben der serumfreien Kultivierung; ■ ■ Proben der serumfreien Kultivierung mit Zusatz von Insulin und Transferrin; ▲ ▲ Proben der serumhaltigen Kultivierung.

#### 4.1.2.3 Scale-up der JAR-Kultivierung

Die kontrollierte Massenproduktion von sekretorischen Proteinen durch eukaryontische Zellen ist wegen der hohen Ansprüche, die diese Zellen an Nährstoffe und Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffversorgung stellen, wegen des hohen Kontaminationsrisikos sowie der Empfindlichkeit der Zellen gegen Scherkräfte und toxische Stoffwechselprodukte extrem schwierig. Um Zellkulturüberstand mit möglichst hoher spezifischer XT-Aktivität zu erhalten, wurden alle Maßnahmen zur Produktionssteigerung unter serum- und proteinfreien Bedingungen durch Kultivierung der Zellen in Hybridoma-Medium bzw. Ultradoma PF-Medium durchgeführt.

JAR-Zellen sind adhärente Zellen, daher ist die Gesamtproduktion an XT dieser Zellen abhängig von der zur Verfügung stehenden Wachstumsfläche. Durch den Einsatz von COSTAR-Rollerflaschen mit glatter Oberfläche wurde die Wachstumsfläche für die JAR-Zellen von 175 cm<sup>2</sup> (große ZKF) auf 900 cm<sup>2</sup> vergrößert. Trotz der für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen notwendigen geringen Umdrehungsgeschwindigkeit der Rollerflaschen von 0,1 U/min konnten die Zellen an der glatten Oberfläche der Flaschen nicht adhären sondern aggregierten und starben ab. Daher wurden FALCON-Rollerflaschen mit gefalteter Oberfläche eingesetzt, die zudem eine größere Wachstumsfläche von 1750 cm<sup>2</sup> haben. Bei einer Einsaat von  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> war die Rollerflasche nach 5 bis 6 Tagen voll bewachsen und produzierte etwa das Zehnfache an XT bei gleicher spezifischer Aktivität wie eine große ZKF.

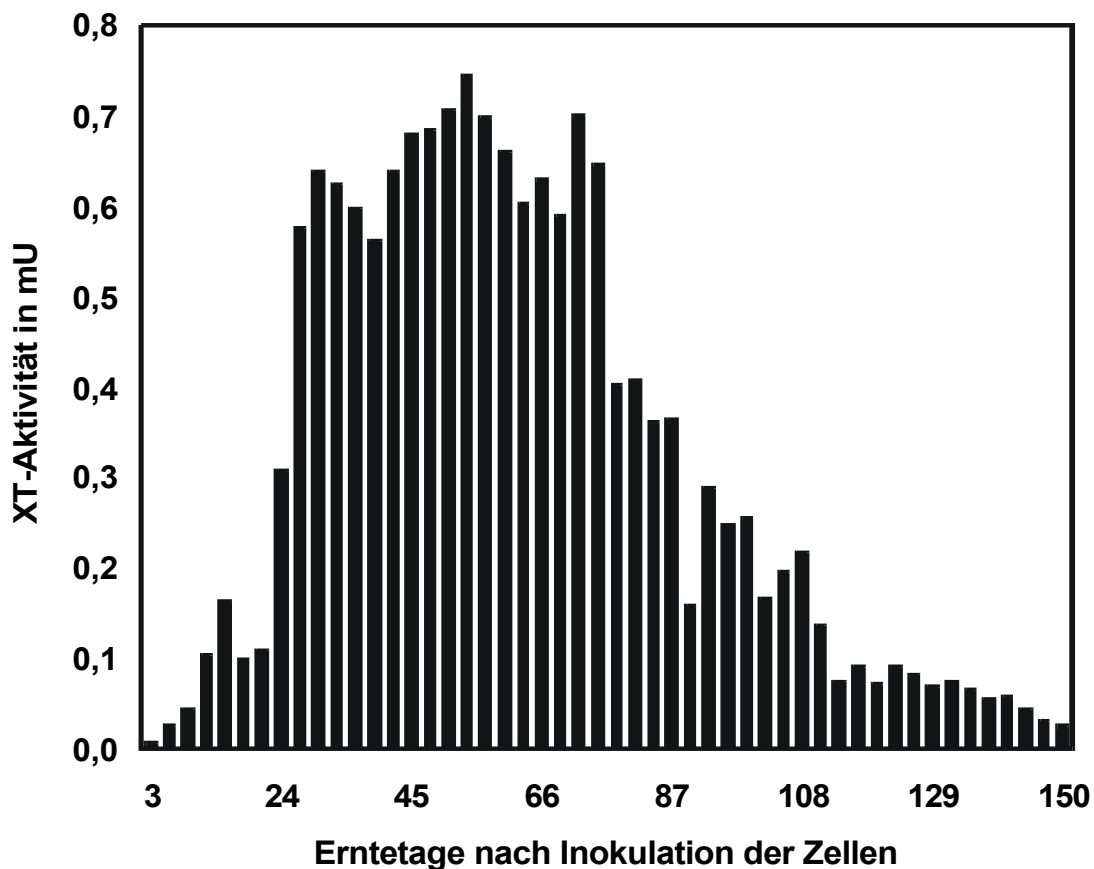


**Abb. 14** Kultivierung von JAR-Choriokarzinom-Zellen auf Cytodex 3. Unbewachsene Mikroträger-Kügelchen (1). Teilweise mit JAR-Zellen bewachsene Mikroträger sowie Zellen in Suspension (2 und 3). Aggregation der mit JAR-Zellen bewachsenen *Microcarrier* (4).

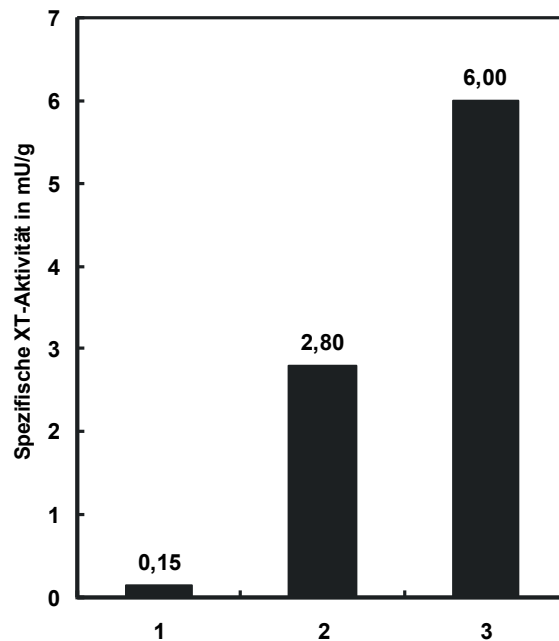
Die zur weiteren Vergrößerung der Wachstumsfläche auf 13800 cm<sup>2</sup> in einem Spinner eingesetzten Mikroträger-Kügelchen aus Kollagen (Cytodex 3) wurden von den JAR-Zellen nur partiell bewachsen (Abb. 14). Außerdem aggregierten Träger und Zellen (Abb. 14), so daß die Zellen schließlich abstarben. Selbst in RPMI 1640 mit 10 % FCS konnten die Choriokarzinom-Zellen nicht befriedigend auf Cytodex 3 kultiviert werden.

Durch den Aufbau von gewebeähnlichen Strukturen, d. h. durch die dreidimensionale Kultivierung von Zellen, erhält man höchste Zelldichten und damit größte Mengen von sekretorischen Proteinen. Um große Mengen XT zu erzeugen, wurden deshalb 10<sup>8</sup> JAR-Choriokarzinom-Zellen aus konventioneller Zellkultivierung in den Extrakapillarraum (EC) eines Hybrid-Hohlfaserbioreaktors des Systems TECNOMOUSE inokuliert. Die Prozeßführung an dem Bioreaktor während der Aufbau- und Produktionsphase beinhaltete Medienwechsel und periodische Ernten. Bereits ein Tag nach Inokulation der Zellen war der Lactatgehalt im 12 ml großen EC auf 14,2 mmol/l angestiegen. Dagegen enthielt das 2,0 l Versorgungsmedium zum gleichen Zeitpunkt, trotz maximaler Fließgeschwindigkeit des Mediums von 150 ml/h, nur 2,6 mmol/l Lactat. Entsprechend war die Glucosekonzentration im Interkapillarraum (IC) von 28,9 mmol/l auf 27,4 mmol/l zurückgegangen, während der EC nur noch 19,6 mmol/l Glucose enthielt. Ein analoges Ungleichgewicht bestand auch zwischen der NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration von IC mit 0,53 mmol/l und EC mit 1,22 mmol/l. Die XT-Aktivität des geernteten Zellkulturüberstandes war mit 0,2 mU/l in etwa so hoch wie das durch serumfreie Kultivierung in Zellkulturflaschen mit diesen Zellen erreichte Aktivitätsmaximum. Nach zwei Tagen war bereits eine toxische Lactatkonzentration von mehr als 20 mmol/l im EC erreicht, ohne daß ein entsprechender Lactatanstieg im Versorgungsmedium gemessen werden konnte. Ein unzureichender Austausch niedermolekularer Komponenten durch die permeablen Cuprophankapillaren führte offensichtlich zu einem überproportionalen Anstieg von Stoffwechselendprodukten (Lactat, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) bzw. zu einem starken Abfall von Nährstoffen (Glucose) im EC. Ursache für die Mangelversorgung bzw. -entsorgung war letztendlich eine unerwünschte Gasansammlung in der Vorkammer des Reaktors, die zu einer ungleichförmigen Mediumdurchströmung der Hohlfasern führte. Durch den Einbau eines Sartobran® 300 Sterilfilters, der an seiner „upstream“-Seite anfallende Luftblasen über eine hydrophobe PTFE-Membran entweichen läßt, in den Mediumstrom vor der Vorkammer konnte die Gasansammlung in der Vorkammer des Reaktors unterbunden werden. In dem modifizierten Reaktorsystem wurden nur noch geringfügige Unterschiede zwischen den Konzentrationen der niedermolekularen Substanzen im EC und denen im IC gemessen.

Im Verlauf der ersten beiden Monate nach Inokulation der JAR-Zellen stieg die XT-Aktivität im Erntemedium des Reaktors abgesehen von kleineren bzw. größeren Schwankungen kontinuierlich an und erreichte am 54. Tag ein Maximum (Abb. 15), das im Vergleich zur statischen Kultivierung (ZKF, Roller) eine um das 282fache erhöhte XT-Konzentration zeigte. Nach knapp drei Monaten ging die XT-Produktion stark zurück, gleichzeitig wurde das bis zu diesem Zeitpunkt fast klare Erntemedium durch zunehmend ausgeschwemmte tote Zellen nach und nach trüb. Während des fünfmonatigen Reaktorbetriebs wurden insgesamt 57 l Ultradoma-Medium verbraucht und hierbei 15,8 mU XT gebildet. Damit ersetzte der Kleinreaktor im Durchschnitt 24 große Zellkulturflaschen bzw. 2,4 gefaltete Rollerflaschen. Die XT im Erntemedium des Bioreaktors war nicht nur durchschnittlich um das 120fache angereichert, sondern auch um ein Mehrfaches reiner, d. h. die spezifische XT-Aktivität lag bei 6,0 mU/g gegenüber 2,8 mU/g im Zellkulturüberstand von serumfreier Kultivierung in Zellkulturflaschen (Abb. 16). Da sich mit dem System TECNOMOUSE fünf Hybrid-Hohlfaserbioreaktoren parallel betreiben lassen, konnte die XT-Produktion pro System um das Fünffache erhöht werden.



**Abb. 15** XT-Produktion innerhalb eines Hybrid-Hohlfaserbioreaktors (eine Kulturkassette) des Systems TECNOMOUSE bei serumfreier Kultivierung von JAR-Choriokarzinom-Zellen im EC des Reaktors.



**Abb. 16** Spezifische XT-Aktivität des JAR-Zellkulturüberstandes bei konventioneller serumhaltiger Kultivierung (1), konventioneller serumfreier Kultivierung (2) und bei serumfreier Kultivierung in Hybrid-Hohlfaserbioreaktoren (3).

#### 4.1.3 Lösen der Xylosyltransferase

Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Glykosyltransferasen, die am Aufbau von Proteoglykanen beteiligt sind, wird die XT aktiv in das extrazelluläre Medium sezerniert und reichert sich dadurch im Zellkulturüberstand an [73]. Die XT liegt damit schon in gelöster Form vor, so daß der mit XT angereicherte Zellkulturüberstand direkt zur Aufreinigung des Enzyms eingesetzt werden kann. XT-Aktivitäten im Überstand diverser Zelllinien sind in 4.1.2.1 bzw. Tab. 2 aufgeführt.

#### 4.1.4 Stabilität der Xylosyltransferase

Bei jedem Konzentrierungs- und Reinigungsschritt ist die Stabilisierung der XT in ihrer aktiven Form grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolierung des Enzyms, denn bis heute kann die XT nur über ihre Aktivität detektiert werden.

XT-haltige Lösungen konnten ohne merklichen Aktivitätsverlust mehrere Male eingefroren und wieder aufgetaut werden. Im gefrorenem Zustand waren XT-haltige Lösungen über Monate haltbar, selbst bei RT war die XT in Zellkulturüberstand mehrere Tage stabil.

#### 4.1.4.1 pH-Wert

Gegenüber moderaten Änderungen der Wasserstoffionen-Konzentrationen war die XT im Bereich von pH 5 bis pH 10 relativ stabil. Die XT-Aktivität wurde aber durch die jeweils eingesetzte Puffersubstanz stark beeinträchtigt. Beispielsweise zeigte der zu diesem Zweck eingesetzte ZKÜ eine mittlere XT-Aktivität von 0,18 mU/l bei pH 5,0 wenn er mit 0,1 M Natriumacetat gepuffert war. Im gleichen ZKÜ, der dagegen mit 0,1 M PBS gepuffert war, wurde aber nur eine XT-Aktivität von 0,05 mU/l bei gleichem pH-Wert gemessen. ZKÜ gepuffert mit 0,1 M PBS hatte nur eine XT-Aktivität von 0,14 mU/l bei pH 7,5 und 0,16 mU/l bei pH 8,0 gegenüber einer XT-Aktivität von 0,29 mU/l sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 8,0 bei 0.1 M Tris/HCl gepuffertem ZKÜ (siehe Tab. 3).

JAR-ZKÜ bzw. Puffer des ZKÜ	pH-Wert	Mittlere XT-Aktivität [mU/l]	Standard-abweichung	
JAR-ZKÜ	6,8	0,23	0,01	
0,1M Natriumacetat	4,0	0,02	0,00	
	4,5	0,05	0,00	
	5,0	0,18	0,01	
	5,0	0,05	0,00	
0,1M PBS	5,5	0,06	0,01	
	6,0	0,11	0,00	
	6,5	0,11	0,01	
	7,0	0,14	0,02	
	7,5	0,14	0,01	
	8,0	0,16	0,01	
	0,1M Tris/HCl	7,5	0,29	0,01
		8,0	0,29	0,01
		8,5	0,26	0,00
		9,0	0,22	0,01
9,5		0,19	0,01	
10,0		0,17	0,01	

**Tab. 3** Übersicht über den Einfluß des pH-Wertes und des Puffersystems auf die XT-Aktivität bezogen auf JAR-ZKÜ als XT-Standard.



#### 4.1.4.2 Oxidations- und Reduktionsempfindlichkeit der Xylosyltransferase

Zur Untersuchung der Oxidations- bzw. Reduktionsempfindlichkeit wurden jeweils 4 XT-Proben auf 50 mM KMnO<sub>4</sub> bzw. auf 50 mM DTT eingestellt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Durch die Oxidation gingen hierbei fast 3/4 der XT-Aktivität verloren, die Reduktion führte dagegen zum vollständigen Aktivitätsverlust (Tab. 4).

<b>XT-Probe</b>	<b>Mittlere XT-Aktivität [mU/l]</b>	<b>Standardabweichung</b>
Ohne Zusatz	0,310	0,005
Mit 50 mM KMnO <sub>4</sub>	0,083	0,017
Mit 50 mM DTT	0,000	0,000

**Tab. 4** Oxidations- bzw. Reduktionsempfindlichkeit der XT. Als XT-Probe wurde angereicherter JAR-ZKÜ eingesetzt.

#### 4.1.4.3 Polarität und Ionenstärke des Mediums

Die Polarität des Mediums beeinflusst generell jede Proteinlösung. Durch Zugabe organischer Lösungsmittel wie Ethanol oder Acetonitril kann die Polarität wässriger Lösungen herabgesetzt werden. Acetonitril ist hierbei wirksamer als Ethanol.

<b>Anteil des org. Lösungsmittels [Vol.-%]</b>	<b>XT-Aktivität [%]</b>	
	<b>Ethanol versetzte Probe</b>	<b>Acetonitril versetzte Probe</b>
0	100	100
10	90	70
20	89	60
25	83	43
30	74	5
40	33	0
50	10	0
60	1	0

**Tab 5** Minderung der XT-Aktivität durch Herabsetzung der Polarität des Mediums. Als XT-Probe wurde angereicherter JAR-ZKÜ eingesetzt.

Um die Auswirkung der Polarität des Mediums auf die Aktivität der XT abzuschätzen, wurden XT-Proben mit unterschiedlicher Ethanol- bzw. Acetonitrilkonzentration gemessen. Die Polaritätsminderung des Mediums führte hierbei unabhängig vom gewählten organischen Lösungsmittel zur Verminderung der XT-Aktivität, wobei Acetonitril wirksamer war als Ethanol (Tab. 5).

Eine Erhöhung der Ionenstärke des Mediums wird durch Zugabe von Salzen erreicht. Da die Ionenstärke definiert ist als  $I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$  mit  $I$  = Ionenstärke,  $c$  = Molarität der Ionen (mol/l) und  $z$  = Ionenladungszahl, ergibt sich bei der Lösung äquimolarer Mengen von NaCl bzw.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eine für die  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung dreifach höhere Ionenstärke. Die Erhöhung der Ionenstärke des Mediums führt zu einem XT-Aktivitätsverlust. Der durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  verursachte Aktivitätsverlust ist aber ungewöhnlich groß, so daß hierbei offensichtlich noch andere Einflußgrößen als die Ionenstärke eine Rolle spielen (Tab. 6).

Salzkonzentration der Probe [M]	XT-Aktivität [%]	
	NaCl-Zusatz	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zusatz
0,00	100	100
0,02	n. g.	44
0,04	n. g.	32
0,05	84	28
0,10	80	20
0,20	79	11
0,30	55	7
0,40	42	3
0,50	41	0
0,60	33	0
0,70	22	0
0,80	19	0
0,90	8	0
1,00	7	0

**Tab. 6** Übersicht über den Einfluß der Ionenstärke auf die XT-Aktivität (n. g. = nicht gemessen). Als XT-Probe wurde angereicherter JAR-ZKÜ eingesetzt.

#### 4.1.4.4 EDTA als Komplexierungsmittel für schädliche Metallionen

Die meisten Proteine enthalten eine Anzahl von freien Sulfhydryl-Gruppen, die mit Schwermetallionen wie Blei-, Eisen- oder Kupferionen reagieren. Schädliche Schwermetall-Spuren bei der XT-Aufreinigung könnten durch Zugabe von EDTA in einer Konzentration von 0,3 mM komplexiert werden. Andererseits ist die Anwesenheit von bivalenten Kationen wie Mangan oder Magnesium, die durch die Zugabe von EDTA ebenfalls komplexiert werden, für die Aktivität der XT essentiell. Wider Erwarten führen aber geringe Mengen an EDTA in der XT-Probe zu keinem größeren Aktivitätsverlust (Tab. 7).

EDTA-Konzentration der Probe [mM]	XT-Aktivität [mU/l]	XT-Aktivität [%]
0,0	0,86	100
0,1	0,83	97
1,0	0,83	97
5,0	0,72	84
10,0	0,36	42
ZKÜ mit EDTA gesättigt	0,11	13

Tab. 7 Übersicht über den Einfluß von EDTA auf die XT-Aktivität. Als XT-Probe wurde JAR-ZKÜ eingesetzt.

#### 4.1.5 Konzentrierung und Aufreinigung der Xylosyltransferase

Bei der Proteinaufreinigung sind Konzentrierungsschritte von zentraler Bedeutung, da höhere Proteinkonzentrationen den Proteinverlust durch unspezifische Adsorption an Gefäßoberflächen und an Säulenmatrizes minimieren. Außerdem wird dadurch das Volumen der Proteinlösung reduziert und ist damit leichter zu handhaben.

Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der XT wurde der Zellkulturüberstand von JAR-Choriokarzinom-Zellen verwendet, da der Überstand dieser Zellen von den untersuchten Zellkulturüberständen die höchste XT-Aktivität zeigte und es sich bei dieser Zelllinie um schnell wachsende Zellen handelt, die auch serum- und proteinfrei kultiviert werden können (siehe 4.1.2).

Bei der Kultivierung von JAR-Zellen in dem Hybridhohlfaser-Bioreaktor TECNOMOUSE reicherte sich die XT durch die spezielle Kompartimentierung des Reaktors innerhalb des Reaktorraums mehr als 100fach an (siehe 4.1.2.3). Eine weitere Konzentrierung des Enzyms kann dann durch Vakuumkonzentrierung, Lyophilisation, Ultrafiltration, Fällung oder Dialyse erfolgen.

Unter Ausnutzung der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Proteine kann nach einer erfolgreichen Anreicherung der XT die Abtrennung der störenden Proteine durch chromatographische bzw. elektroforetische Methoden erfolgen.

#### **4.1.5.1 Vakuumkonzentrierung, Lyophilisation, Ultrafiltration bzw. Diafiltration**

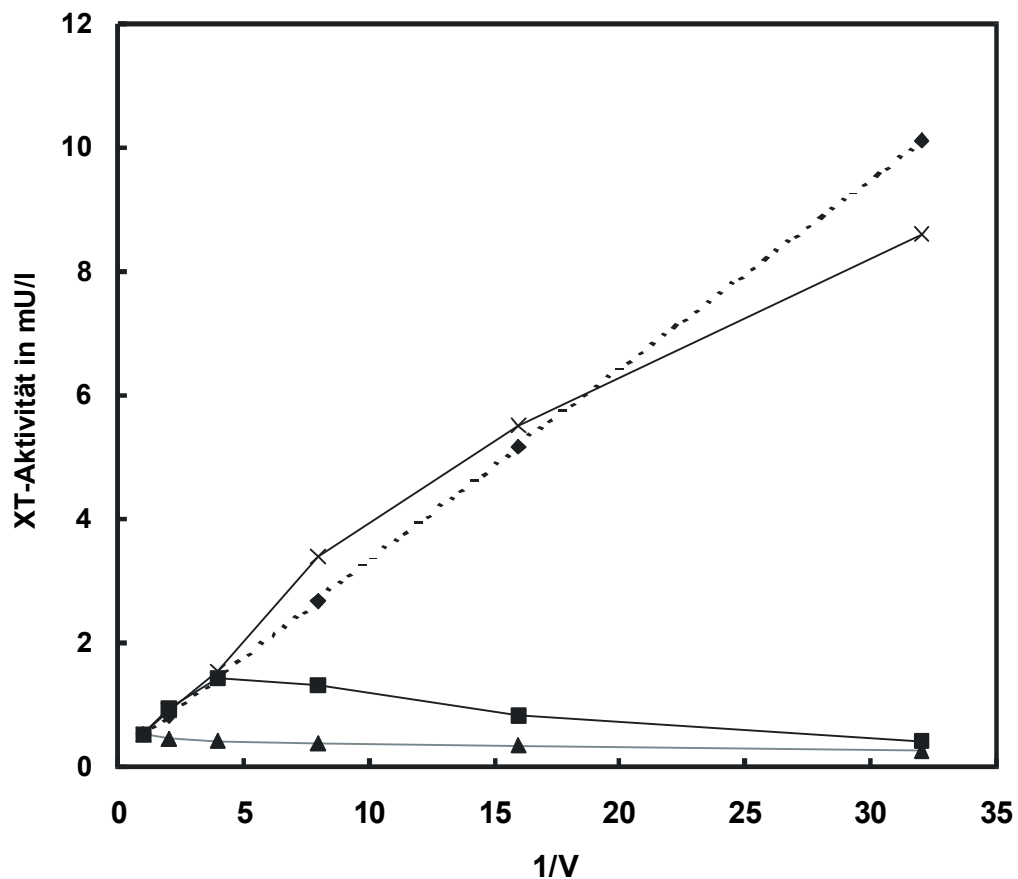
Die durch das Abdampfen flüchtiger Bestandteile im Unterdruck erreichte Aufkonzentrierung biologisch aktiver XT im ZKÜ wurde, wie erwartet, durch die hierbei gleichzeitige Erhöhung der Salzkonzentration der Probe limitiert, so daß lediglich eine XT-Aktivitätssteigerung um das Vierfache erreicht wurde (siehe Abb. 17). Bei der Lyophilisation konnte aus dem gleichen Grund keine effektive Anreicherung biologisch aktiver XT erreicht werden. Das Lyophilisat zeigte zwar nach Zugabe von 50 mM MES-Puffer, pH 6,5 wieder eine geringfügige XT-Aktivität, doch war diese bedeutend niedriger (ca. 1/10) als die zur Aufkonzentrierung eingesetzte XT-Aktivität.

Eine bescheidene Anreicherung aktiver XT wurde durch Ultrafiltration von serumhaltigem ZKÜ mit einer Spiralzelle an einer Zelluloseacetatmembran mit einer nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze (NMGT) von 5.000 nach dem Kreuzstromverfahren erreicht. Die hierbei erreichte XT-Aktivitätsverdopplung des Retentats stand aber in keinem Verhältnis zur theoretisch berechneten Verzehnfachung der XT-Konzentration. Die Ultrafiltration von serumfreiem ZKÜ führte hierbei jedoch nur zur Abreicherung aktiver XT (siehe Abb. 17).

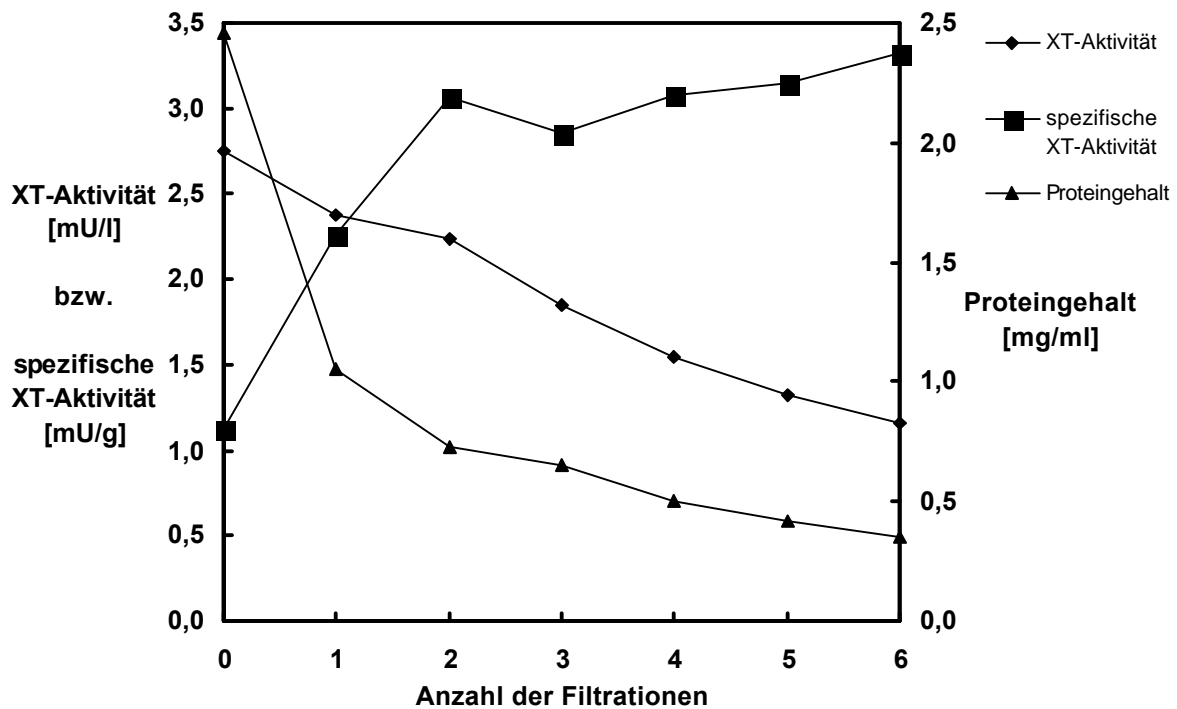
Als sanftere Form der Ultrafiltration wurde die Aufkonzentrierung der XT-haltigen Probe in einer Rührzelle an einer Membran aus inerten nichtionischen Polymeren mit einer NMGT von 10.000 (PM10) mit 3,7 bar Überdruck bei langsamer Rührgeschwindigkeit (ca. 100 U/min) gewählt. Eine reproduzierbare Konzentratszunahme aktiver XT konnte dadurch aber nicht erreicht werden. Um niedermolekulare Substanzen, die eventuell für die XT-Aktivität essentiell sein könnten, zurückzuhalten, wurde dann die NMGT auf 1.000 verringert. Außerdem wurde ein anderes Membranmaterial aus regenerierter Zellulose mit besonders niedrigem Proteinbindungsvermögen (YM1) verwendet, um unspezifische Adsorptionen an der

Membranoberfläche zu verringern. Die an dieser Membran (YM1) durchgeführte Ultrafiltration führte schließlich zu einer reproduzierbaren Anreicherung aktiver XT, die der theoretisch berechneten sehr nahekam (siehe Abb. 17).

Bei der Diafiltration an einer YM1-Membran ergab sich pro Konzentrierungs- und Verdünnungsschritt (jeweils 1:10) ein XT-Aktivitätsverlust von ca. 10 %, so daß selbst nach acht Filtrationsschritten noch über 40 % der eingesetzten Ausgangsaktivität im Retentat enthalten waren. Da die im Retentat enthaltene Proteinmenge durch Proteinpräzipitation gleichzeitig auf etwa 1/5 des Ausgangswertes sank, war die spezifische XT-Aktivität im Endprodukt um mehr als das Doppelte erhöht (siehe Abb. 18).



**Abb. 17** Aufkonzentrierung enzymatisch aktiver XT in serumfreien JAR-Zellkulturüberstand durch unterschiedliche Anreicherungsverfahren. ◆-◆ theoretische, ideale Anreicherung, ▲-▲ Spiralzelle, ■-■ Vakuumkonzentration, X-X Rührzelle, ( $1/V = 1/\text{Retentionsvolumen}$ ).



**Abb. 18** XT-Aktivitätsverlust durch Diafiltration. Durch eine im Vergleich zur XT relativ hohe Proteinpräzipitation von kontaminierenden Proteinen stieg die spezifische XT-Aktivität der Probe um mehr als das Doppelte.

#### 4.1.5.2 Optimierung der Ammoniumsulfatpräzipitation

Weil bereits geringe Mengen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  die XT-Aktivität stark vermindern (siehe 4.1.4.3), wurde die Ammoniumsulfatfällung in Kombination mit der Diafiltration der XT-Proben untersucht. Der zur systematischen Optimierung der Präzipitation verwendete aufkonzentrierte und entsalzene JAR-ZKÜ hatte einen Proteingehalt von 1,83 mg/ml und zeigte eine XT-Aktivität von 2,32 mU/l. Die XT präzipitierte oberhalb 30 % Ammoniumsulfat-sättigung der Probe. Zur Aufreinigung der XT erwies sich eine fraktionierte Fällung mit 28 % bzw. 40 % Ammoniumsulfatsättigung als ideal. Der Proteingehalt des im adäquaten Volumen gelösten Präzipitats betrug 0,21 mg/ml. Die XT-Aktivität dieser Lösung wurde mit 0,96 mU/l bestimmt. Nach 100facher Entsalzung durch Diafiltration erhöhte sich die XT-Aktivität der Lösung auf 2,24 mU/l bei nahezu unveränderter Proteinkonzentration. Mit der optimierten fraktionierten Ammoniumsulfatfällung konnte somit eine 8,7fache Aufreinigung der XT aus aufkonzentriertem JAR-ZKÜ erreicht werden.

#### 4.1.5.3 Proteinauftrennung an Ionenaustauschermedien

Die Auftrennung von Proteinen an Ionenaustauschermedien beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der positiv oder negativ geladenen Austauschermatrix und den elektrisch geladenen Gruppen auf der Oberfläche der Proteine.

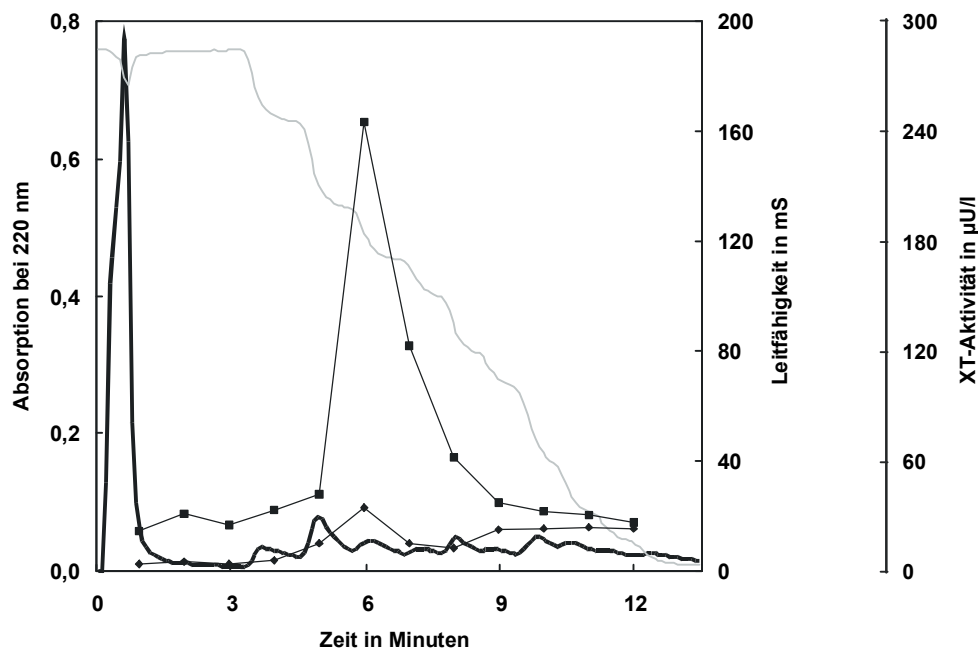
Das aus JAR-Zellkulturüberstand erhaltene, durch Gelfiltrationschromatographie (GFC) entsalzene und über Ultrafiltration aufkonzentrierte XT-haltige komplexe Proteingemisch konnte zu mehr als 80 % sowohl an starke bzw. schwache Anionen- als auch an starke bzw. schwache Kationenaustauschermedien gebunden werden. Mehr als 85 % der aufgetragenen XT wurden von allen eingesetzten Austauschermatrixen (siehe 6.7.2) durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden. Die beste Auftrennung der Proteinmatrix lieferte, nach Optimierung der Elutionsbedingungen, der starke Anionenaustauscher POROS 20 HQ. Im Rahmen der Maßstabsvergrößerung konnte unter weitgehender Erhaltung der Trennleistung der Säule (16 × 100 mm) bis zu 15 mg Protein (3 ml Ultrafiltrationsprodukt) pro Chromatographie-Zyklus aufgetragen werden. Hierbei wurden 95 % des aufgegebenen Proteins an die Austauschermatrix gebunden und nur 5 % waren im Durchlauf enthalten. Die Ionenaustauschchromatographie (IEC) konnte hinsichtlich der XT-Gesamtausbeute nahezu verlustfrei durchgeführt werden, doch konnten nur 58 % der aufgegebenen XT-Menge in einer Fraktion angereichert werden. Da diese Fraktion aber nur 6 % der pro Chromatographie-Zyklus eingesetzten Proteinmenge enthielt, wurde die XT durch die IEC um den Faktor 10 aufgereinigt. Im Durchlauf war praktisch keine XT-Aktivität meßbar. Der größte Teil der XT wurde bereits durch 0,15 M NaCl im Laufmittel eluiert, weitere größere XT-Elutionen erfolgten bei 0,30 M und 0,50 M NaCl.

#### 4.1.5.4 Proteinauftrennung durch Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen

Bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) werden Biomoleküle aufgrund der unterschiedlichen hydrophoben Gruppen auf ihrer Oberfläche getrennt. Im Gegensatz zur *Reversed-Phase*-Chromatographie (RPC), bei der stark hydrophobe Medien eingesetzt werden, erfolgt die Auftrennung hier an moderat hydrophoben Oberflächen. Obwohl beide chromatographischen Verfahren auf der Basis hydrophober Wechselwirkungen Biomoleküle separieren, gibt es hinsichtlich der Proteinauftrennung einen grundlegenden Unterschied. Durch die stark hydrophoben Wechselwirkungen zwischen RPC-Matrix und Protein kommt es bei der RPC zur Auffaltung und damit zur Denaturierung der meisten Proteine. Dagegen bleiben bei der HIC, wegen der weniger starken hydrophoben Wechselwirkungen, die

dreidimensionale Struktur der meisten Proteine und damit ihre funktionellen Eigenschaften weitgehend erhalten.

Von den getesteten hydrophoben Medien zur Aufreinigung der XT (siehe 6.7.3) zeigte die HPLC-Matrix POROS 20 PE hinsichtlich der erreichbaren Auftrennung der Proteine des eingesetzten JAR-ZKÜ das beste Ergebnis (Abb. 19). Hierbei konnten bei einer Salzkonzentration von 3 M NaCl in 50 mM Tris/HCl bei pH 7,0 etwa 40 % der in der Probe detektierbaren Proteine an die Matrix gebunden werden. Wegen der hohen Salzkonzentration des Laufmittels war im Durchlauf keine, im Eluat nur eine geringe XT-Aktivität meßbar. Durch 100faches Entsalzen mit *Microcon*-Einheiten (NMGT von 3.000, siehe 6.5.3) konnten ca. 80 % der ursprünglich zur HIC eingesetzten XT-Aktivität wiedergewonnen werden. Nur 29 % der aufgegebenen XT-Aktivität waren hierbei nach der Entsalzung in einer Fraktion enthalten. Die Fraktion enthielt 9 % des in der HIC eingesetzten Proteins, so daß mit dieser Methode bei einer XT-Ausbeute von 29 % eine XT-Aufreinigung um Faktor 3 erreicht wurde.



**Abb. 19** Elutionsprofil der Hydrophoben Interaktionschromatographie an POROS 20 PE. Ein Aliquot von 2 ml JAR-Zellkulturüberstand wurde analog zum Laufmittel auf 3 M NaCl eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,0 mit 3 M NaCl erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit fallendem NaCl-Gradienten (graue Linie). Die Proteinelution wurde bei 220 nm detektiert (schwarze Linie) und 10 ml Fraktionen zur Bestimmung der XT-Aktivität (◆) gesammelt. Nach dem Entsalzen der Fraktionen mit *Microcon*-Einheiten wurde die XT-Aktivität erneut bestimmt (■).



#### 4.1.5.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie nutzt die spezifische Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen zur selektiven Aufreinigung eines Proteins. Das zu erkennende Molekül (Ligand) ist hierbei kovalent an eine unlösliche feste Matrix gebunden. Nach der Probenaufgabe werden die nichtbindenden Moleküle von der Matrix gewaschen und anschließend werden die Eigenschaften der mobilen Phase so verändert, daß die gebundenen Moleküle von den Liganden dissoziieren.

Da eine Enzymreaktion naturgemäß auf der Substraterkennung beruht, sollten sich zur Aufreinigung eines Enzyms insbesondere Substrate bzw. Substratanaloga als Liganden bei der Affinitätschromatographie eignen. Die beteiligten Moleküle bei der Xylosyltransferase katalysierten Reaktion, die UDP-D-Xylose und diverse Xyloseakzeptoren, wurden deshalb auf ihre Substratspezifität untersucht (siehe 4.1.1.1 bzw. Tab. 1). Als Ligand sind auch Enzyminhibitoren und Cofaktoren des Enzyms interessant. Deshalb wurden immobilisiertes Heparin bzw. Chondroitinpolysulfat (GAGPS) als Affinitätsmedien für die Aufreinigung der XT untersucht, da beide Substanzen, wie in der Literatur beschrieben [74], die XT-Aktivität sehr stark mindern. Aus der gleichen Substanzklasse wurden außerdem Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat C und Hyaluronsäure als potentiell geeignete Affinitätsmedien untersucht. Protamine, dies ist eine Gruppe von argininreichen Proteinen, stimulieren die Enzymaktivität von Chondroitin-6-sulfotransferase und Heparansulfat-6-sulfotransferase, also von Transferasen, die wie die XT am Aufbau von Proteoglykanen beteiligt sind [75-78]. Deshalb wurde der Einfluß dieser stark positiv geladenen Proteine auf die XT-Aktivität gemessen und ihre Eignung als Affinitätsmedium für die XT untersucht (siehe Tab. 8).

Die Chromatographie an immobilisierten Farbstoffmolekülen, die die Struktur von biospezifischen Liganden besitzen, wird als Pseudo-Affinitätschromatographie bezeichnet. Der Farbstoff bindet hierbei oft im aktiven Zentrum des Proteins und beeinflußt damit die Eigenschaft des Polypeptids. Um Farbstoffe als eventuell geeignete Affinitätsliganden zu ermitteln, wurde die Wirkung der bei der Pseudo-Affinitätschromatographie üblicherweise verwendeten Farbstoffe auf die XT-Aktivität untersucht. Danach wurde ihre Eignung als Affinitätsmedium für die XT-Aufreinigung getestet (siehe Tab. 8).

Matrix	Protein [%]		XT-Aktivität [%]		
	Durchlauf	Eluat	Durchlauf	Eluat	Verlust
POROS 20 OH	99	1	76	5	19
POROS 20 AI BK-V	89	11	20	29	51
POROS 20 BA QEEE...	98	2	33	36	31
POROS 20 EP SENE	96	4	36	38	26
POROS 20 EP TENE	99	1	63	18	19
POROS 20 AI FGF-basic	77	23	34	14	52
POROS 20 EP UDP	98	2	63	20	17
POROS 20 OH DCC UDP	47	53	29	67	4
POROS 20 OH DVS UDP	83	17	24	39	37
POROS 20 OH DVS PLP	91	9	55	24	21
POROS 20 HE	43	57	0	66	34
POROS 20 AI GAGPS	55	45	11	53	36
POROS 20 AI ChSulf. A	72	28	60	38	2
POROS 20 AI ChSulf. C	67	33	53	45	2
POROS 20 AI HyalUrs.	79	21	67	31	2
POROS 20 AI Protamin.	39	61	1	70	29
POROS 20 AI Aprotinin	26	74	1	64	35
POROS 20 MC	81	19	22	4	74
POROS 20 AI CB	61	39	1	3	96
POROS 20 AI RG	63	37	1	1	98
POROS 20 AI RY	90	10	37	8	55

**Tab. 8** Übersicht über die durchgeführten Chromatographien an diversen potentiellen Affinitätsmedien zur Aufreinigung der XT. Die in den grau unterlegten Feldern aufgeführten Affinitätsmedien eignen sich am besten für die Entwicklung einer Affinitätschromatographie zur Isolierung der XT. Die Matrixbezeichnungen bedeuten folgendes:

POROS 20 OH:	POROS-Trägermatrix aus Polystyrendivinylbenzen mit underivatisierter hydroxylierter Oberfläche. Partikeldurchmesser: 20 µm.
POROS 20 AI BK-V:	An POROS 20 AI gekoppeltes rekombinantes $[V^{36}, V^{38}, \delta^{81}], [G^{92}, I^{94}, \delta^{82}]$ - Bikunin (Kopplung über Aldehyd).
POROS 20 BA QEEE...:	An POROS 20 BA gekoppeltes Peptid Biot-QEEEGSGGGQKK-amid (Biotin-Streptavidinkopplung).

---

POROS 20 EP SENE:	An POROS 20 EP gekoppeltes Peptid SENEGSGMAEQK (Kopplung über Epoxid).
POROS 20 EP TENE:	An POROS 20 EP gekoppeltes Peptid TENEGSGLTNIK.
POROS 20 Al FGF-basic:	An POROS 20 Al gekoppeltes Peptid PALPEDGGSGAFPPGHFK-DPKRLY.
POROS 20 EP UDP:	An POROS 20 EP gekoppeltes UDP.
POROS 20 OH DCC UDP:	An POROS 20 OH gekoppelte homopolyme Ketten aus UDP mit einer Kettenlänge von bis zu 10 Nucleotiden.
POROS 20 OH DVS UDP:	An POROS 20 OH über den Spacer Divinylsulfon (DVS) ge-koppeltes UDP.
POROS 20 OH DVS PLP:	An POROS 20 OH über den Spacer DVS gekoppeltes Pyridoxal-phosphat (PLP).
POROS 20 HE:	An POROS-Trägermaterial gekoppeltes Heparin.
POROS 20 Al GAGPS:	An POROS 20 Al gekoppeltes Chondroitinpolysulfat (GAGPS, Adequan <sup>®</sup> ).
POROS 20 Al ChSulf. A:	An POROS 20 Al gekoppeltes Chondroitinsulfat A.
POROS 20 Al ChSulf. C:	An POROS 20 Al gekoppeltes Chondroitinsulfat C.
POROS 20 Al HyalUrs.:	An POROS 20 Al gekoppelte Hyaluronsäure.
POROS 20 Al Protamin.:	An POROS 20 Al gekoppeltes Protamin.
POROS 20 Al Aprotinin:	An POROS 20 Al gekoppeltes Aprotinin.
POROS 20 MC:	An POROS-Trägermaterial gebundenes Imidodiacetat.
POROS 20 Al CB:	An POROS 20 Al gekoppeltes <i>Cibacron Blue 3GA</i> .
POROS 20 Al RG:	An POROS 20 Al gekoppeltes <i>Reactive Green 5</i> .
POROS 20 Al RY:	An POROS 20 Al gekoppeltes <i>Reactive Yellow 2</i> .

Die Eignung unterschiedlicher Affinitätsmedien für die Aufreinigung der XT kann nur dann verglichen werden, wenn die Chromatographie an allen Medien unter gleichen chromatographischen Bedingungen durchgeführt wird. Für die Chromatographie wurde jeweils eine 4,6 x 50 mm (0,83 ml) mit dem entsprechenden Affinitätsmedium gepackte Säule eingesetzt. Als XT-Probe wurden bei jedem Lauf 100 µl der gleichen Charge des über GFC entsalzten und durch Ultrafiltration an YM1 100fach aufkonzentrierten JAR-Zellkulturüberstandes aufgetragen. Als Laufmittel diente jeweils 50 mM Natriumacetat, pH 6,0. Die Elution der an der Säule gebundenen Proteine erfolgte stets durch einen Stufengradienten von 10 CV 0,6 M NaCl im Laufmittel. Jede Chromatographie wurde bei einer Flußgeschwindigkeit von 10 ml/min und bei RT durchgeführt.

Um das Bindevermögen des reinen, nicht aktivierten Trägermaterials POROS 20 OH bezüglich Protein bzw. XT zu bestimmen, wurde zudem eine Chromatographie unter analogen Bedingungen an diesem Material durchgeführt. Das Ergebnis der Chromatographie an POROS 20 OH bzw. das der einzelnen Affinitätschromatographien zeigt Tab. 8.

Die unspezifische Bindung von Proteinen an die underivatisierte hydroxylierte Oberfläche des POROS-Trägermaterials betrug unter den o. a. Bedingung ca. 1 % der aufgegebenen Proteinmenge, dagegen wurden immerhin ca. 5 % der aufgegebenen XT an das Material gebunden.

Unter den in Tab. 8 aufgeführten XT-Akzeptorsubstraten zeigte erwartungsgemäß das an POROS 20 Al gebundene rekombinante  $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$  Bikunin bei der Affinitätschromatographie die stärksten Wechselwirkungen mit der XT. Allerdings waren selbst hierbei noch 20 % der aufgegebenen XT-Menge im Durchlauf enthalten. Obwohl UDP im XT-Test die XT-Aktivität nahezu vollständig inhibierte (siehe 4.1.1.1, Tab. 1), zeigte immobilisiertes UDP bei der Affinitätschromatographie nur relativ schwache Wechselwirkungen mit der XT. Nach der Einführung eines Spacers (DVS) oder durch die Kopplung von homopolymeren UDP-Ketten konnte bei der nachfolgenden Chromatographie zwar mehr XT an die modifizierte Affinitätsmatrix gebunden werden, die im Durchlauf enthaltene XT betrug aber immer noch mehr als 20 % der aufgegebenen XT-Menge. Unter den o. a. chromatographischen Bedingungen war die Affinitätschromatographie weder an den aufgeführten immobilisierten XT-Akzeptorsubstraten noch an dem immobilisierten UDP sehr effektiv.

Von den immobilisierten Glykosaminoglykanen Heparin, GAGPS, Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat C und Hyaluronsäure zeigte Heparin die stärkste Wechselwirkung mit der XT, sie wurde vollständig an die Heparinmatrix gebunden. Im Durchlauf wurde keine XT-

Aktivität gemessen. Offensichtlich besitzt die XT eine Heparinbindestelle. Ähnlich gut wurde die XT durch Protamin und durch Aprotinin gebunden. Bei der Chromatographie an diesen beiden Affinitätsmatrizes wurden jeweils lediglich ca. 1 % der aufgegebenen XT-Menge im Durchlauf gemessen. Der XT-Aktivitätsverlust betrug bei allen drei Chromatographien (Heparin-, Protamin-, Aprotininmatrix) jeweils etwa 1/3 der aufgegebenen XT-Menge. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß der relativ hohe Salzgehalt des Eluats die XT-Aktivität mindert, so daß der tatsächliche Verlust an XT geringer sein sollte.

#### **4.1.5.6 Isoelektrische Fokussierung und isoelektrischer Punkt der Xylosyltransferase**

Die Fokussierung war mit hohen XT-Aktivitätsverlusten verbunden. Bereits die Zugabe der Ampholyte zu der zu fokussierenden Probe führte zu einem Aktivitätsverlust von etwa 10 %. Bei der anschließenden Fokussierung gingen weitere 72 % XT-Aktivität verloren. Die Ausgangslösung hatte eine XT-Aktivität von 2,26 mU/l. Nach der Fokussierung hatte die Fraktion mit dem pH-Wert 6,5 mit 1,12 mU/l die höchste XT-Aktivität. Weder eine Anreicherung der XT-Aktivität noch eine Aufreinigung konnte mit der nativen isoelektrischen Fokussierung erreicht werden. Der unter sukzessivem Einengen des pH-Bereichs der nativen isoelektrischen Fokussierung ermittelte isoelektrische Punkt der XT lag bei pH 6,5.

#### **4.1.6 Kombination der Reinigungsschritte und Isolierung der Xylosyltransferase**

##### **4.1.6.1 Ausgangsmaterial zur Isolierung der Xylosyltransferase**

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der XT wurde JAR-ZKÜ wegen der hohen absoluten und spezifischen XT-Aktivität des Zellkulturüberstandes aus serumfreier Kultivierung in Hybrid-Hohlfaserbioreaktoren verwendet (siehe 4.1.2 bzw. Abb. 16). Zur Herstellung des XT-haltigen Überstandes wurden insgesamt 2000 l UD-Medium eingesetzt und ein Proteinkonzentrat von 18,5 l mit einer XT-Aktivität von 0,54 U gewonnen. Durch gezielte Auswahl und Kombination der Reinigungsmethoden wurde die spezifische Aktivität der XT sukzessiv erhöht (siehe 4.1.6.6 bzw. Tab. 9).

#### 4.1.6.2 Abtrennung großer Proteinmengen

Um das Probevolumen zu reduzieren, wurde der ZKÜ zunächst durch Ultrafiltration an YM1-Membranen bei 4°C aufkonzentriert. Das Volumen des Überstandes konnte hierbei bis auf 800 ml nahezu ohne XT-Aktivitätsverlust verringert werden. Zur effektiven Abtrennung großer Proteinanteile diente die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung mit 28 % bzw. 40 % Ammoniumsulfatsättigung. Das XT-haltige Präzipitat der zweiten Fällung konnte in 460 ml 20 mM Natriumacetat, pH 6,0 gelöst werden. Bei dem Reinigungsschritt wurden fast 90 % der verunreinigenden Proteine von der XT abgetrennt.

#### 4.1.6.3 Heparin-Affinitätschromatographie

Da durch Rekonstitution der Fällungspräzipitate die XT noch relativ viel Ammoniumsulfat enthielt, wurde die Chromatographie an einer Heparinmatrix gewählt, weil dieses Polysaccharid die XT im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen sehr fest bindet, wobei geringe Salzkonzentrationen in der Probe nicht stören.

Um die Vorteile einer Perfusions-Chromatographie zu nutzen, wurde die Aufreinigung an einer 16 x 100 mm mit POROS 20 HE gepackten Säule durchgeführt. Als mobile Phase diente 20 mM Natriumacetat, pH 6,0. Die Flußrate betrug 40 ml/min. Pro Lauf konnten ohne merkliche Verringerung der Auflösung der Säule bis zu 4,0 ml Probe aufgegeben werden. Der relativ hohe Salzgehalt der aufgetragenen Probe zeigte sich in der erhöhten Leitfähigkeit des Durchlaufs. Trotz dieser Salzkonzentration wurde die XT aber vollständig an die Heparinmatrix gebunden. Als Ergebnis der Optimierung (siehe 6.7.4.6) erfolgte die Elution der an Heparin gebundenen Proteine durch einen NaCl-Stufengradienten mit 1,0 CV 0,09 M NaCl; 1,0 CV 0,15 M NaCl; 1,5 CV 0,24 M NaCl; 1,2 CV 0,30 NaCl; 1,2 CV 0,60 M NaCl; 1,2 CV 1,00 M NaCl und 1,2 CV 1,89 M NaCl in der mobilen Phase, wobei die XT bei ca. 40 mS eluiert wurde, was einer NaCl-Konzentration von etwa 0,50 M entspricht (siehe Abb. 20 A). Die ersten 32 chromatographischen Läufe waren sehr gut reproduzierbar, dann aber nahm die Auflösung mit jedem weiteren Lauf stark ab, so daß nach 36 Läufen das Säulenmaterial ersetzt werden mußte. Eine komplexe Regeneration des Säulenmaterials blieb erfolglos. Im Rahmen einer zyklischen Chromatographie wurden insgesamt 115 Läufe durchgeführt. Die XT-haltigen Fraktionen der einzelnen Läufe wurden für den nachfolgenden Reinigungsschritt vereinigt.

#### 4.1.6.4 Auftrennung durch elektrostatische Wechselwirkungen

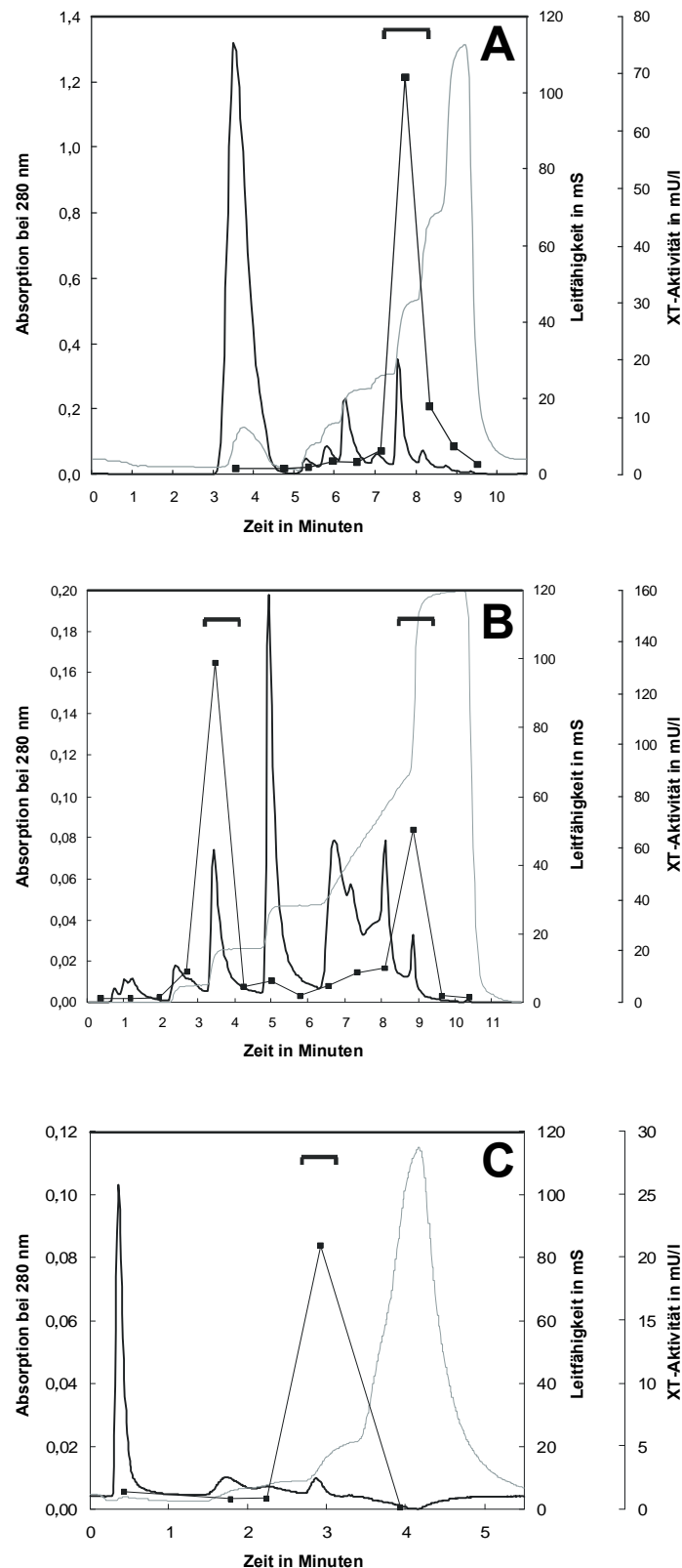
Das XT-haltige Eluat der Heparin-Affinitätschromatographie wurde an einer YM1-Membran 100fach entsalzt und gleichzeitig auf 50 ml aufkonzentriert.

Als nächster Reinigungsschritt wurde die Ionenaustauschchromatographie (IEC) wegen ihres hohen Auflösungsvermögens und der großen Proteinbindekapazität von Ionenaustauschermedien gewählt. Die beste Auftrennung der Probe erfolgte mit Hilfe eines starken Anionenaustauschers an einer 16 x 100 mm mit POROS 20 HQ gepackten Säule mit 20 mM Tris/HCl, pH 9,0 als Laufmittel. Es wurden 4 ml Probe pro Lauf auf die Säule gegeben. Der geringe Salzgehalt der Probe ermöglichte eine nahezu vollständige elektrostatische Bindung der XT an den Ionenaustauscher. Als Ergebnis der Elutionsoptimierung (siehe 6.7.2) wurden ein Stufengradient mit 2,2 CV 0,07 M NaCl; 3,0 CV 0,18 M NaCl und 3,0 CV 0,36 M NaCl, gefolgt von einem linearen Gradienten von 0,36 M NaCl auf 1,0 M NaCl in 5,0 CV und einer Stufe von 3,0 CV 2,0 M NaCl in der mobilen Phase gefahren. Die größte Menge XT wurde bei der relativ niedrigen Salzkonzentration von ca. 0,12 M bzw. 15 mS eluiert. Eine weitere XT-Elution erfolgte dagegen erst bei der sehr viel höheren Salzkonzentration von etwa 1,0 M bzw. 78 mS (Abb. 20 B). Alle 13 durchgeführten chromatographischen Läufe waren gut reproduzierbar.

#### 4.1.6.5 Aufreinigung an immobilisiertem Protamin

Für einen weiteren effektiven Reinigungsschritt wurden die XT-haltigen IEC-Fractionen an einer YM1-Membran 100fach entsalzt und auf 5 ml aufkonzentriert.

Die XT-Aufreinigung an immobilisiertem Protamin wurde als weiterer Isolierungsschritt gewählt (siehe Tab. 8). Es wurden 100 µl der sterilfiltrierten Probe auf eine 4,6 x 50 mm Protaminsäule aufgegeben. Als mobile Phase diente 20 mM Natriumacetat, pH 6,0. Da das Protamin an eine POROS-Matrix gekoppelt war, konnte die Chromatographie als Perfusions-Chromatographie mit einer Flußrate von 10 ml/min bei RT durchgeführt werden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Stufen von 4,84 CV 0,04 M NaCl; 4,06 CV 0,06 M NaCl; 3,29 CV 0,23 M NaCl und einem linearen Gradienten mit 2,50 CV von 0,72 M NaCl bis 1,20 M NaCl in der mobilen Phase. Im Vergleich zu den übrigen Proteinen wurde die XT relativ spät bei einer Leitfähigkeit der mobilen Phase von ca. 12 mS bzw. einer NaCl-Konzentration von ca. 0,15 M eluiert (Abb. 20 C). Die im Rahmen einer zyklischen Chromatographie durchgeführten 50 Läufe waren alle sehr gut reproduzierbar.



**Abb. 20** Reinigung der humanen Xylosyltransferase. **(A)** Heparin-Affinitätschromatographie an POROS 20 HE (siehe 4.1.6.3); **(B)** Ionenaustausch-Chromatographie an POROS 20 HQ (siehe 4.1.6.4); **(C)** Protamin-Affinitätschromatographie an immobilisiertem Protamin (siehe 6.1.6.5). Die Proteinelution wurde durch die Absorption der mobilen Phase bei 280 nm gemessen (schwarze Linie), und der NaCl Gradient wurde durch die Messung der elektrischen Leitfähigkeit detektiert (graue Linie). In den einzelnen gesammelten Fraktionen wurde die XT-Aktivität (■) bestimmt. Die horizontalen Klammern zeigen die Fraktionen, die im nachfolgenden Reinigungsschritt eingesetzt (**A, B**) bzw. für die SDS-PAGE gesammelt wurden (**C**).



#### 4.1.6.6 Übersicht über die kombinierten Reinigungsschritte

Reinigungsstufe	Volumen	XT-Gesamt-aktivität	Gesamt-protein	spezifische XT-Aktivität	Reinigung	Ausbeute
	ml	$10^{-3}$ x units	mg	$10^{-3}$ x units/mg	-fach	%
Proteinkonzentrat aus JAR-Zellkulturüberstand	18.500	535,8	89.355,0	0,006	1	100
Ammoniumsulfatfällung	460	426,0	8.937,8	0,048	8	79
Heparin-Affinitätschromatographie	50	108,3	473,0	0,229	40	35
Ionenaustausch-Chromatographie	5	91,0	43,1	2,090	348	17
ProtamIn-Affinitätschromatographie	1	6,8	0,2	28,458	4.743	1

**Tab. 9** Übersicht der Reinigungsschritte zur Isolierung der Xylosyltransferase. Als Ausgangsmaterial zur Aufreinigung des Enzyms wurden 18,5 l stark angereicherter JAR Zellkulturüberstand (entsprechen 2000 l normalem ZKÜ) aus serumfreier Kultivierung eingesetzt.

## 4.2 Charakterisierung der Xylosyltransferase

### 4.2.1 Reinheit der isolierten Xylosyltransferase

Als ein Kriterium für die Reinheit der XT-Präparation kann die spezifische Enzym-Aktivität dienen. Eine Einzelbande bei der SDS-PAGE kann als weiteres Kriterium der Reinheit betrachtet werden.

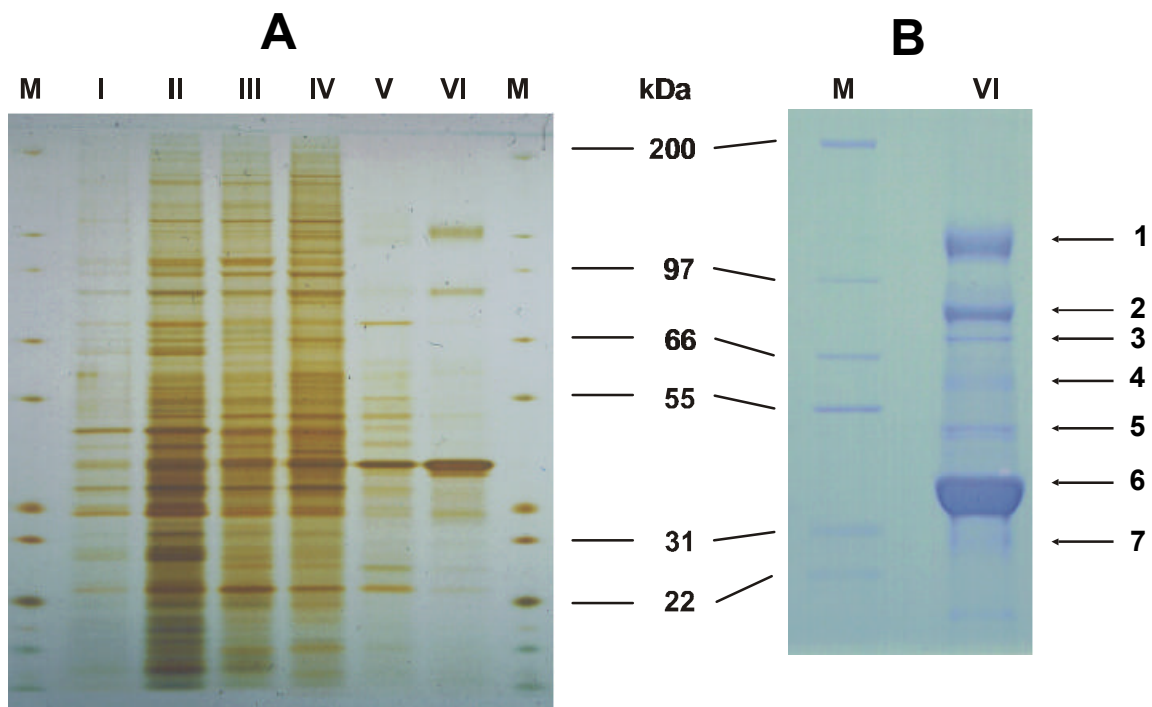
#### 4.2.1.1 Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität

Mit einer spezifischen XT-Aktivität von 28,5 mU/mg Protein ist die aufgereinigte XT etwa 4.700fach reiner als der zur Aufreinigung eingesetzte Zellkulturüberstand. Das gereinigte XT-Präparat hat im Vergleich zu humaner Serum-XT (spezifische XT-Aktivität ca.  $1,3 \cdot 10^{-6}$  mU/mg Protein) eine mehr als  $2 \cdot 10^6$  fach größere spezifische XT-Aktivität.

#### 4.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigter Xylosyltransferase

Um die Reinheit der XT-Präparation abzuschätzen, wurde die nach jeder Reinigungsstufe erhaltene XT-Fraktion in einem 4-12 % Gradienten-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 21). Das gereinigte XT-Präparat zeigte noch sieben Proteinbanden im SDS-Gel (Abb. 21, Lauf VI). Durch MALDI-Analyse konnten alle Proteine mit Ausnahme des 120 kDa Proteins eindeutig charakterisiert werden. Dabei wurden folgende Proteine identifiziert: Hexose-6-phosphat-Dehydrogenase (89 kDa), Ezrin (68 kDa), Quiescin Q6 (64 kDa), Plasminogen Aktivator (47 kDa), Aldolase A (39 kDa) und niedermolekulare Artefakte.

Die singuläre 120 kDa Bande ergab bei der MALDI-Analyse ein bisher unbekanntes MALDI-Spektrum.



**Abb. 21** SDS-PAGE der XT-Fractionen unterschiedlicher Reinigungsstufen.

(A) XT-Fractionen diverser Reinigungsstufen wurden in einem 4-12 % Gradienten-Gel aufgetrennt. *Lauf I*, JAR-Zellkulturüberstand (Rohprodukt); *Lauf II*, Ultrafiltrationsretentat; *Lauf III*, gelöstes Ammoniumsulfatpräzipitat; *Lauf IV*, XT-Probe nach Heparin-Affinitätschromatographie; *Lauf V*, XT-Probe nach Ionenaustausch-Chromatographie; *Lauf VI*, XT-Probe nach Protamin-Affinitätschromatographie; *Lauf M*, Proteingrößenstandard: Myosin (200 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), BSA (66 kDa), Glutamindehydrogenase (55 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Trypsininhibitor (22 kDa). Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

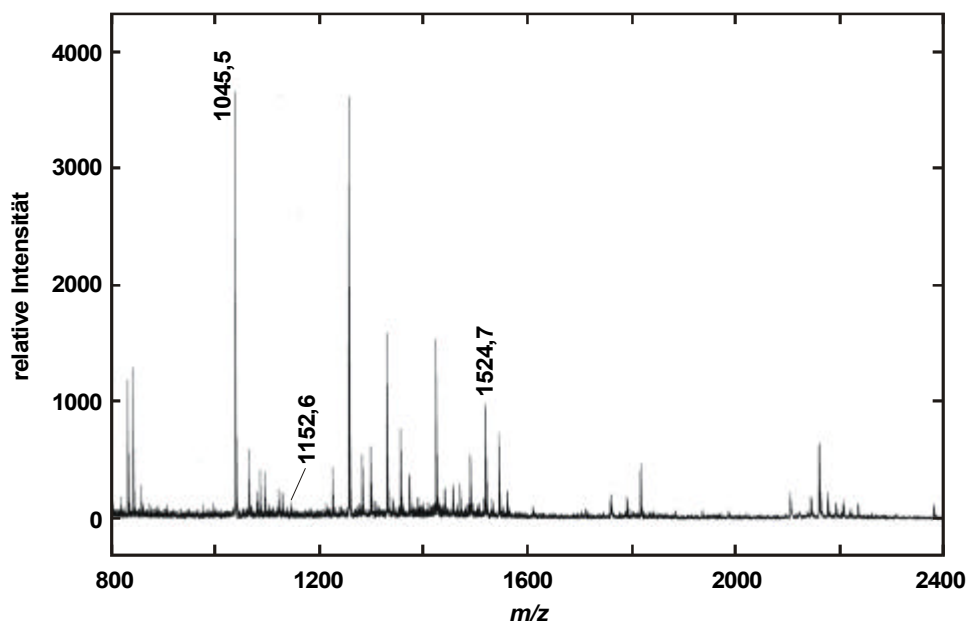
(B) Die gesammelten Fractionen der Protamin-Affinitätschromatographie wurden in einem 4-12 % Gradienten-Gel aufgetrennt. Die Pfeile zeigen ein bisher unbekanntes Protein, die XT (120 kDa) (1), Hexose-6-phosphat-Dehydrogenase (89 kDa) (2), Ezrin (68 kDa) (3), Quiescin Q6 (64 kDa) (4), Plasminogen-Aktivator (47 kDa) (5), Aldolase A (39 kDa) (6) und niedermolekulare Artefakte (7). Alle Proteine wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue R 250 gefärbt.

#### 4.2.2 Proteinsequenzanalyse

Die 120 kDa Bande wurde aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin bzw. Endoproteinase Lys-C verdaut. Die proteolytischen Fragmente wurden durch RP-HPLC aufgetrennt. Es konnten 11 Peptide isoliert werden. Die einzelnen Peptide wurden durch automatische Aminosäuresequenzanalyse (Edman-Abbau) untersucht. Die hierbei erhaltenen Aminosäuresequenzen sind in Tab. 10 aufgeführt. Aus der Sequenzierung und der anschließenden MALDI-Analyse (Abb. 22) geht hervor, daß es sich bei der Sequenz ELGAVKPDGRL offensichtlich um das carboxyterminale Ende des 120 kDa Proteins handelt, da dieses Peptid vollständig sequenziert werden konnte und weder Arginin noch Lysin als C-terminale Aminosäure besitzt (Tab. 10).

Peptide	gemessene Massen (M + H <sup>+</sup> )	berechnete Massen (M + H <sup>+</sup> )
1. ELGAK		
2. PPSRQKELLK		
3. DMNFLK		
4. IASPPSDFGR	1045,5	1045,5
5. LLLDX		
6. DFENVDNSNFAPR	1524,7	1525,7
7. PTF FAR		
8. LQFSEVGTDXDAX		
9. ELGAVKPDGRL	1152,6	1153,7
10. ELLKRKLEQQEK		
11. LGLLMPEK		

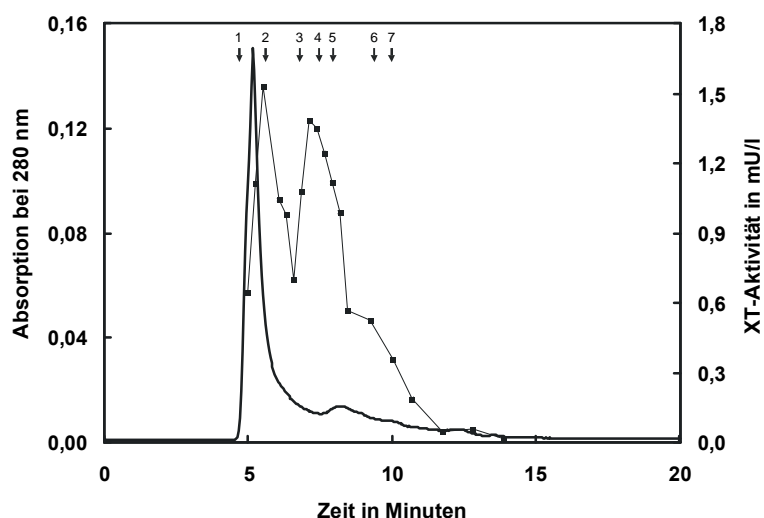
**Tab. 10** Aminosäuresequenzen und Massen von Peptiden des enzymatisch gespaltenen 120 kDa Proteins. Die Peptide 1 - 8 wurden durch Trypsin-verdau, die Peptide 9 - 11 durch Verdau mit Lys-C aus dem isolierten 120 kDa Protein erhalten. X bezeichnet eine nicht identifizierte Aminosäure. Die Masse von drei Peptiden wurden im MALDI-TOF-Massenspektrum (siehe Abb. 22) des enzymatisch gespaltenen 120 kDa Protein detektiert. Aus der Sequenzierung und der MALDI-Analyse (Abb. 22) geht hervor, daß es sich bei der Sequenz ELGAVKPDGRL offensichtlich um das carboxyterminale Ende des Proteins handelt.



**Abb. 22** MALDI-TOF Massenspektrum des tryptisch gespaltenen 120 kDa Proteins. Die angegebenen Massen von 1045,5 sowie 1152,6 und 1524,7 entsprechen denen der Peptide IASPPSDFGR, ELGAVKPDGRL und DFENVDNSNFAPR.

#### 4.2.3 Molekulargewicht der Xylosyltransferase

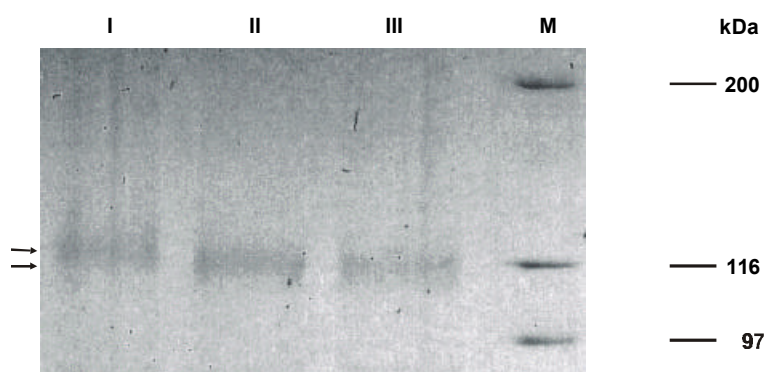
Zur Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Proteins wurden 100  $\mu$ l partiell gereinigte XT unter nichtreduzierenden und nichtdenaturierenden Bedingungen an einer TSK G3000 SW FPLC Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Hierbei wurden zwei XT-Aktivitätsmaxima, eines bei 120 kDa und eines bei 500 kDa detektiert (Abb. 23).



**Abb. 23** Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen XT. 100  $\mu$ l XT-Probe wurden an einer TSK G3000 SW FPLC Säule unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Die Proteinelution wurde durch die Absorption der mobilen Phase bei 280 nm gemessen (schwarze Linie). Die Pfeile zeigen die Elutionsposition von Thyroglobulin (669 kDa) (1), Ferritin (440 kDa) (2), Aldolase (158 kDa) (3), Albumin (67 kDa) (4), Ovalbumin (43 kDa) (5), Chymotrypsinogen A (25 kDa) (6) und Ribonuklease A (13,7 kDa) (7). In den gesammelten 200  $\mu$ l Fraktionen wurde die XT-Aktivität bestimmt (■).

#### 4.2.4 Nachweis der N-glykosidischen Modifikation der Xylosyltransferase

N-Glykosidase F spaltet praktisch alle N-glykosidisch verknüpfte Zuckerketten in Proteinen. Nach dem Verdau der gereinigten XT mit N-Glykosidase F erscheint die Proteinbande des Enzyms bei ca. 116 kDa (Abb. 24). Das Ergebnis zeigt, daß es sich bei dem Protein um ein Glykoprotein handelt, das einen N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratanteil von ca. 3 % besitzt. Die XT-Aktivität wurde durch die Inkubation mit N-Glykosidase F nicht nachweislich reduziert.

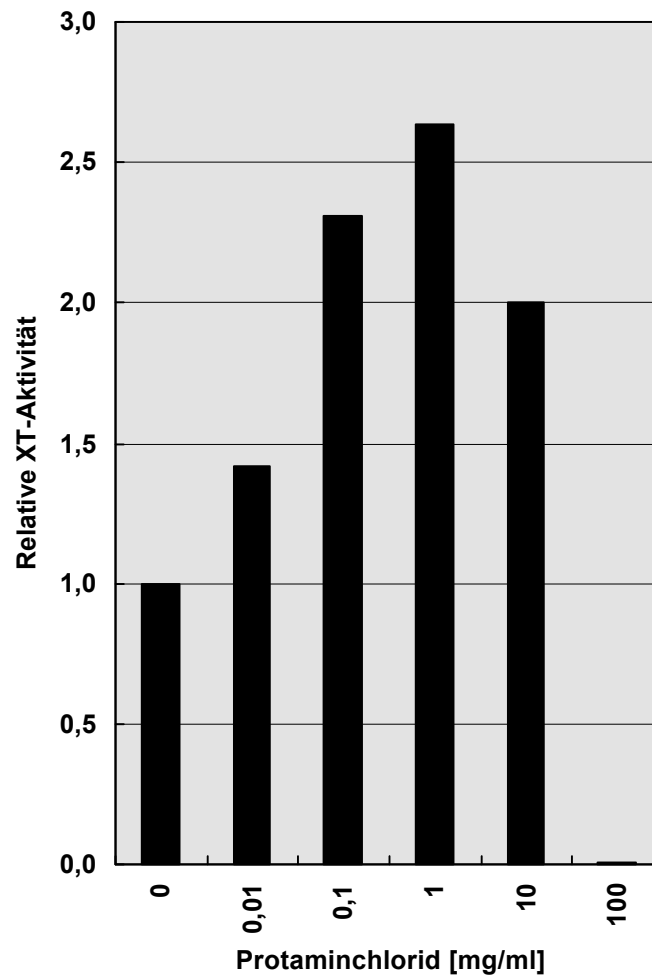


**Abb. 24** SDS-PAGE der XT vor und nach N-Glykosidase F-Abbau. *Lauf I*: 1 µg XT; *Lauf II*: 1 µg XT nach 1 h Inkubation bei 37°C mit  $3,1 \cdot 10^{-3}$  units N-Glykosidase F; *Lauf III*: 1 µg XT nach 12 h Inkubation bei 37°C mit  $3,1 \cdot 10^{-3}$  units N-Glykosidase F; *Lauf M*: Proteingrößenstandard: Myosin (200 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase (97 kDa). Die Banden wurden durch Silberfärbung detektiert.

#### 4.2.5 Aktivierung und Inhibierung der Xylosyltransferase

Potentielle XT-Inhibitoren wurden bereits in 4.1.1.1 aufgeführt und untersucht (siehe Tab. 1). Protaminchlorid wurde als potentieller Aktivator im XT-Test getestet, da das argininreiche Polypeptid eine aktivierende Wirkung bereits bei diversen Sulfotransferasen zeigte [75-78]. Auch die XT-Aktivität konnte durch Zugabe von Protaminchlorid im Testansatz mehr als verdoppelt werden (Abb. 25).

Der Einfluß des pH-Wertes und des Puffersystems auf die XT-Aktivität ist in 4.1.4.1 untersucht und dort in Tab. 3 dargestellt. Die Wirkung von Oxidations- und Reduktionsmitteln sowie von der Polarität und der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die XT-Aktivität ist in 4.1.4.2 und 4.1.4.3 untersucht bzw. in Tab. 4 - 6 zusammengefaßt.



**Abb. 25** Übersicht zur Aktivierung der XT-Aktivität durch Protaminchlorid. Als XT-Standard (Relative XT-Aktivität = 1) wurde JAR-ZKÜ eingesetzt.

### 4.3 Immunchemie

Mit Hilfe polyklonaler Antiseren gegen das 120 kDa-Protein bzw. gegen von ihm abgeleitete Aminosäuresequenzen soll gezeigt werden, ob es sich bei dem isolierten Protein tatsächlich um die XT handelt. Zudem ermöglichen Antikörper die Herstellung von Immunaффinitäts-säulen, immunologische Nachweistests, histologische Untersuchungen an Gewebeschnitten und das Testen von cDNA-Banken. Da für eine Kaninchenimmunisierung zu wenig Material des 120 kDa-Proteins zur Verfügung stand, wurden Antikörper gegen dieses Protein über sequenzhomologe synthetische Peptide hergestellt.

Basierend auf den Sequenzdaten des 120 kDa-Proteins (siehe 4.2.2 bzw. Tab. 10) wurden Oligonukleotid-Primer synthetisiert. Mit diesen Primern wurde mit Hilfe der Polymerase-

kettenreaktion aus der cDNA einer Chondrosarkomzelllinie neun Klone mit überlappenden cDNA-Fragmenten in einer Größe von 0,8 bis 1,7 kbp erhalten [79]. Die abgeleitete Aminosäuresequenz aus den zusammengesetzten DNA-Fragmenten bzw. die nach enzymatischer Spaltung des 120 kDa-Proteins erhaltenen Aminosäuresequenzen (siehe 4.2.2 bzw. Tab. 10 und [79]) dienten der Auswahl geeigneter Antigene zur Immunisierung von Kaninchen. Mit Hilfe computerunterstützter Antigenizitätsblots wurden die folgenden Peptide ausgewählt:

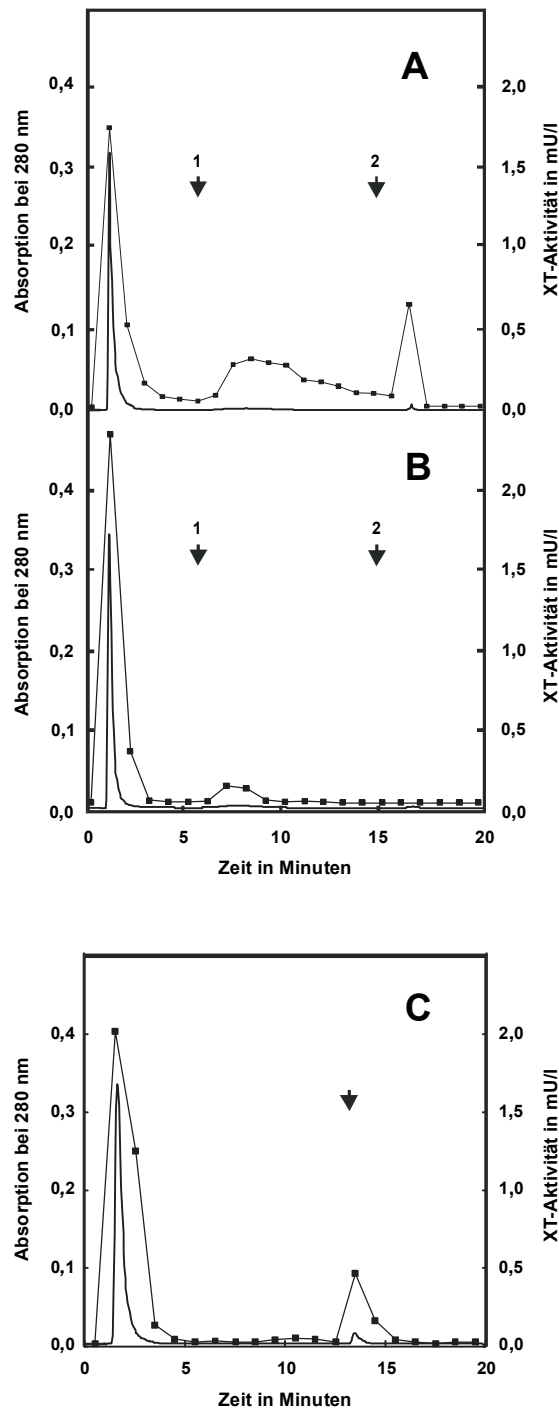
Peptid 1: CSRQKELLKRKLEQQEK

Peptid 2: CQFSEVGTDWDAKER

#### **4.3.1 Antigen-Antikörper-Reaktion**

Zur Herstellung einer Immunaффinitätsmatrix wurden gereinigte polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen das Peptid 1 (CSRQKELLKRKLEQQEK) immobilisiert und durch Triethanolamin mit der Säulenmatrix kovalent verbunden.

Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen (siehe 6.8.8) wurden bei einer Aufgabe von 10 µg des synthetischen Peptids auf die Säulenmatrix ca. 50 % des Antigens gebunden und anschließend wieder eluiert. Der Rest des Peptids wurde entweder nicht an die Säule gebunden oder nicht eluiert. Von einer aus JAR-Zellkulturüberstand und durch Heparin-Aффinitätschromatographie partiell gereinigten XT-Probe wurden nur 3 % des Probenproteins an die Antikörpermatrix gebunden. Das Eluat enthielt aber 1/4 der wiedergefundenen XT-Aktivität (Abb 26 A). Wenn dagegen immobilisiertes Präimmunserum als Affinitätsmatrix eingesetzt wurde, wurde praktisch keine XT-Aktivität an der Matrix adsorbiert bzw. von der Matrix eluiert (Abb. 26 B). Wie die Abb. 26 C, zeigt werden 2/3 der an die Antikörpermatrix gebundenen XT-Aktivität durch 100 µl des synthetischen Peptids spezifisch eluiert, wenn die Konzentration des Peptids in der mobilen Phase 1 mg/ml beträgt. Die Neutralisation des pH-Wertes (siehe 6.8.8) der gesammelten Fraktionen unmittelbar nach der Elution war essentiell für die XT-Aktivität.

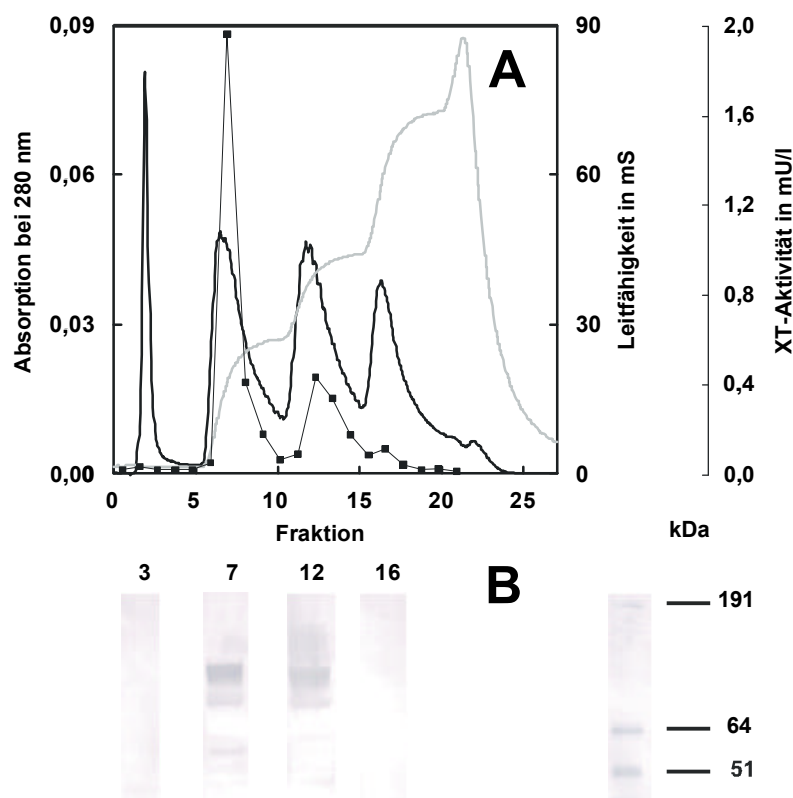


**Abb. 26** Immunaffinitätschromatographie der Xylosyltransferase. **(A)** 100  $\mu$ l XT-Probe wurden auf die Immunaffinitätsmatrix gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 wurden unspezifisch gebundene Proteine mit 150 mM NaCl in der mobilen Phase von der Säule gewaschen (Pfeil 1). Die an die Antikörper gebundenen Antigene wurden anschließend mit 12 mM HCl eluiert (Pfeil 2). 1 ml Fraktionen wurden in Gefäßen mit 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 gesammelt. Die Proteinelution wurde durch die Absorption bei 280 nm gemessen (schwarze Linie) und die XT-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt (■). **(B)** Negativkontrolle der Immunaffinitätschromatographie mit immobilisiertem Präimmenserum als Matrix. **(C)** Immunaffinitätschromatographie mit kompetitiver Elution durch das Peptid-Antigen. 100  $\mu$ l XT-Probe wurden auf die Immunaffinitätsmatrix gegeben und unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Der Pfeil zeigt die Elution durch 100  $\mu$ l (1 mg/ml) Peptid-Antigen. 1 ml Fraktionen wurden in Gefäßen mit 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 gesammelt. Die Proteinelution wurde durch die Absorption bei 280 nm gemessen (schwarze Linie) und die XT-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt (■).



### 4.3.2 Immundetektion der Xylosyltransferase

Die aus JAR-Zellkulturüberstand erhaltene und durch Heparin-Affinitätschromatographie partiell aufgereinigte XT-Probe konnte nach der Entsalzung an einer YM1-Membran durch Aprotinin-Affinitätschromatographie in drei Hauptfraktionen aufgetrennt werden (Abb. 27 A). Das Elutionsprofil der Säule zeigt deutlich, daß praktisch die komplette XT-Aktivität an die Affinitätsmatrix gebunden wurde. Im Durchlauf konnte keine XT-Aktivität gemessen werden. Von der an der Aprotininmatrix adsorbierten aktiven XT wurden 61 % durch 0,30 M NaCl und weitere 21 % XT durch 0,54 M NaCl freigesetzt. Durch eine Immunreaktion mit den Antikörpern gegen das vom 120 kDa-Protein abgeleitete Peptid CSRQKELLKRKLEQQEK konnte in den XT-haltigen Fraktionen das 120 kDa-Protein nach SDS-PAGE und Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 27 B). Dagegen wurde das 120 kDa-Protein weder im praktisch XT-freien Durchlauf noch in der XT-freien Fraktion detektiert.



**Abb. 27** Aprotinin-Affinitätschromatographie partiell gereinigter XT und Western Blot der aufgetrennten Fraktionen. **(A)** 200  $\mu$ l XT-Probe wurden auf die Aprotininsäule gegeben. Nach dem Waschen der Säule wurden adsorbierte Proteine durch eine Kombination von Stufen- und linearen NaCl-Gradienten eluiert (graue Linie). Die Proteinelution wurde bei 280 nm detektiert (schwarze Linie) und in den gesammelten 2 ml Fraktionen wurde die XT-Aktivität bestimmt (■). **(B)** Aliquots von Fraktion 3, 7, 12 und 16 wurden durch Western Blot analysiert. Das 120 kDa-Protein wurde in den XT-haltigen Fraktionen 7 und 12 detektiert. Als *prestained* Proteingrößenmarker wurde Myosin (191 kDa), BSA (64 kDa) und Glutamin-Dehydrogenase (51 kDa) eingesetzt.

### 4.3.3 Inhibierung der XT-Aktivität durch Anti-Peptid-Antikörper

Um die Wirkung der gegen das 120 kDa Protein gerichteten Antikörper bzw. gegen die von dem Protein abgeleiteten Peptide zu untersuchen, wurde die XT-Aktivität im Serum der Kaninchen vor und nach der Immunisierung gemessen. In einem zweiten Ansatz wurde die XT-Aktivität nach der Zugabe einer genau definierten Menge an XT aus JAR-Zellkulturüberstand zum Kaninchenserum bzw. Kaninchenantiserum bestimmt. Die folgenden beiden Peptide wurden zur Immunisierung eingesetzt:

Antigen 1: CSRQKELLKRKLEQQEK

Antigen 2: CQFSEVGTDWDAKER

Entsprechend wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit dem Antigen 1 das Antiserum 1 und durch die mit dem Antigen 2 immunisierten das Antiserum 2 erhalten. Das Antiserum 1 zeigte hierbei keinen merklichen Einfluß auf die XT-Aktivität (Tab. 11), dagegen wurde durch das Antiserum 2 die XT-Aktivität der Probe um etwa 50 % inhibiert (Tab. 12).

Probe	XT-Aktivität des Serums [mU/l]		XT-Aktivität des Serums nach Zugabe von 4 mU/l XT [mU/l]	
	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kaninchen 1	Kaninchen 2
Antigen 1				
Präimmunserum	0,4	0,5	4,8	4,2
Erste Blutung	0,6	0,6	4,6	4,8
Zweite Blutung	-	0,4	-	4,6
Dritte Blutung	-	0,6	-	4,7

Tab. 11 Einfluß des Antiserums 1 auf die XT-Aktivität. Als XT-Probe (4 mU/l) wurde angereicherter JAR-ZKÜ eingesetzt.

Probe	XT-Aktivität des Serums [mU/l]		XT-Aktivität des Serums nach Zugabe von 4 mU/l XT [mU/l]	
	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kaninchen 1	Kaninchen 2
Antigen 2				
Präimmunserum	0,3	0,4	4,9	4,4
Erste Blutung	0,2	0,2	2,6	2,1
Zweite Blutung	0,2	0,3	4,0	1,8
Dritte Blutung	0,1	0,4	3,6	2,5

Tab. 12 Einfluß des Antiserums 2 auf die XT-Aktivität. Als XT-Probe (4 mU/l) wurde angereicherter JAR-ZKÜ eingesetzt.

## 5. Diskussion

Proteoglykane mit Strukturproteinen bilden die scheinbar amorphe Grundsubstanz des Bindegewebes. Die Xylosyltransferase (XT) ist ein Schlüsselenzym beim Aufbau der Proteoglykane. Diese sehr großen Polyanionen binden Wasser und Kationen und besitzen neben der mechanischen Stützfunktion vielfältige weitere essentielle biologische Funktionen. Die XT initiiert bei Proteoglykanen die Synthese der meisten Glykosaminoglykane durch die Übertragung eines Xylosylrestes von UDP-Xylose auf Serinreste des Proteoglykan-*Core*-Proteins. Die Tatsache, daß dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Glykosaminoglykan-Synthese ist und daß hierbei immer nur ganz bestimmte Serinreste des *Core*-Proteins, die Teil einer Consensussequenz sind [65], xylosyliert werden, deuten darauf hin, daß die XT regulatorische Funktion beim Aufbau der Matrix des Bindegewebes besitzt. Weitere Hinweise auf eine regulatorische Funktion ergeben sich durch die Koordination der Expression der XT und der Proteoglykane [49] und durch die Interaktion zwischen der XT und der Galactosyltransferase I [49, 50], dem Enzym, das den nächsten Schritt beim Aufbau der Glykosaminoglykane katalysiert.

Die Struktur der XT blieb, trotz intensiver Bemühungen das Enzym zu isolieren und seinen Aufbau aufzuklären, bis heute völlig unbekannt. Eine Strukturaufklärung des Proteins ist aber unabdingbar, um erste Einblicke in den Funktionsmechanismus des Enzyms zu erhalten oder um darüber hinaus die komplexe Biosynthese von Bindegewebsstrukturen zu verstehen.

Die proteinchemische Isolierung der XT und die nachfolgende Bestimmung erster Sequenzdaten ist für die Strukturaufklärung des Enzyms von zentraler Bedeutung, denn sie ist die ideale Ausgangsbasis zur Ermittlung der DNA-Sequenz, die für das Protein codiert. Darauf aufbauend kann dann die Lokalisierung des XT-Gens erfolgen sowie die Klonierung und Expression bzw. die rekombinante Herstellung des Proteins und die endgültige Klärung der regulatorischen Funktion des Enzyms. Darüber hinaus kann die Sequenz zur Herstellung von Antikörpern dienen, mit denen einerseits eine genauere Untersuchung der XT durchgeführt werden kann, andererseits können diese Antikörper zum Aufbau eines immunologischen Testsystems dienen und damit als diagnostisches Instrument in der klinischen Praxis eingesetzt werden. Wegen der essentiellen Bedeutung der Aminosäuresequenz der XT bildete die Isolierung des Enzyms mit dem Ziel der Generierung erster Sequenzdaten den Schwerpunkt dieser Arbeit.

## 5.1 Wahl und Herstellung des xylosyltransferasehaltigen Ausgangsmaterials

Die Isolierung der XT aus Knorpel von Hühnerembryonen [68] und Rattenchondrosarkomen [69] wurde schon früher publiziert. Obwohl diese Arbeiten bereits 1974 bzw. 1975 durchgeführt wurden, ist bis heute keine Sequenzinformation des Enzyms veröffentlicht worden. Die Isolierung der XT aus diesem Material konnte nicht reproduziert werden [81, 82]. Die Hauptgründe hierfür waren, daß es sich bei diesem Ausgangsmaterial um ein sehr komplexes Stoffgemisch handelt, das einen hohen Proteingehalt besitzt, und daß die XT, wie die meisten anderen Glykosyltransferasen, in organischem Gewebe nur in Spuren vorhanden ist. Bei der Aufarbeitung des Knorpels werden außerdem in großem Maße Zellen, insbesondere Chondrozyten zerstört und dadurch Proteinase freigesetzt, die die Isolierung des Enzyms zusätzlich erschweren. Da die XT, im Gegensatz zu den meisten anderen Glykosyltransferasen, aktiv in den extrazellulären Raum sezerniert wird [73], ist die Isolierung des Enzyms aus Zellkulturüberstand sinnvoller als die Aufarbeitung des organischen Gewebes.

JAR-Choriokarzinom-Zellen von humaner Plazenta zeigen im Vergleich zu anderen Zelllinien die höchsten XT-Bildungsraten [67]. Um ein Ausgangsmaterial mit möglichst hoher spezifischer XT-Aktivität zu produzieren, wurden die Zellen an eine serumfreie Kultivierung adaptiert. Dadurch reduzierte sich zwar die durchschnittliche XT-Aktivität im Zellkulturüberstand auf ca. 20 %, die spezifische XT-Aktivität, war aber wegen des niedrigen Proteingehalts des serumfreien Überstandes im Vergleich zum serumhaltigen Zellkulturüberstand 19fach höher. Die allein durch die serumfreie Kultivierung der JAR-Zellen erreichte hohe XT-Reinheit zeigt sich durch die im Vergleich zu humanem Serum 280fach höhere spezifische XT-Aktivität.

Da XT nur in Spuren vorkommt, war für eine erfolgreiche Isolierung des Enzyms ein *Scale up* der zellulären Synthese erforderlich. Eine erste Produktionssteigerung wurde durch den Einsatz von Rollerkulturflaschen erreicht. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, daß die für die Isolierung der XT notwendige Enzymmenge auf diesem Weg nicht realisiert werden konnte. Um die Zahl der adhären Choriokarzinom-Zellen pro Volumeneinheit zu erhöhen und dadurch die XT-Synthese insgesamt zu steigern, wurden Mikroträger-Kügelchen in Spinnerkulturen eingesetzt. Die JAR-Zellen konnten zwar auf diesen Mikroträgern kultiviert werden, aggregierten aber sehr leicht, so daß die Zellen in den entstandenen lokal sehr hohen Zelldichten offensichtlich nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden konnten, was schließlich zum Absterben der Zellen führte. Diese Unterversorgung der Zellen läßt sich durch die aktive Zuführung von Nährstoffen bzw. die aktive Abführung von Stoffwechsel-

endprodukten weitgehend vermeiden. In der Hohlfasertechnologie wird dieses Versorgungsproblem durch den Einsatz von Tausenden semipermeablen Hohlfasern gelöst, die das Kapillarsystem von versorgenden Blutgefäßen simulieren. Der Einsatz solcher Hohlfasersysteme eignet sich damit insbesondere für die Großproduktion von Säugetierzellen bzw. für die Produktion der von ihnen sezernierten Produkte [83-85]. Zum *Scale-up* der XT-Synthese wurden deshalb die Choriokarzinom-Zellen an einen neuen Hybrid-Hohlfaserbioreaktor (TECNOMOUSE) adaptiert. Der Vorteil dieses Dichtezellbioreaktors bestand darin, daß alle wichtige Komponenten für die Kultivierung der Zellen (Sauerstoffangebot, Zellanheftungsmöglichkeiten, dreidimensionale Kulturkonfiguration, Nährstoffversorgung) im System bereits angelegt sind. Der Interkapillar-Raum (der Raum innerhalb der Hohlfasern, durch den das Medium fließt) und der Extrakapillar-Raum mit den Zellen des Reaktors sind durch semipermeable Hohlfasern mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 10 kDa voneinander getrennt. Hierdurch können sich große Moleküle innerhalb des Extrakapillar-Raums anreichern, niedermolekulare Nährstoffmoleküle bzw. Stoffwechselendprodukte können frei durch die Hohlfasermembran diffundieren und werden dem System entzogen. Nach der Adaption der serumfrei kultivierten JAR-Zellen an das System wurde die Überlegenheit der Hohlfaserkultivierung gegenüber der konventionellen Zellkultivierung insbesondere dadurch deutlich, daß die XT-Aktivität nicht nur mehr als 100fach im Zellkulturüberstand angereichert werden konnte, sondern zudem die spezifische XT-Aktivität des Überstandes mehr als doppelt so hoch war. Die verbesserte Versorgung der Zellen im Reaktor führte offensichtlich zu einer höheren Vitalität der Kultur und zu einer niedrigeren Verunreinigung von kontaminierenden Proteinen durch abgestorbene Zellen. Die spezifische XT-Aktivität im JAR-Zellkulturüberstand konnte im Vergleich zu humanem Serum auf das 600fache gesteigert werden.

## 5.2 Anreicherung und Isolierung der Xylosyltransferase

Die Anreicherung der XT gestaltete sich zunächst schwierig, da unter Verwendung verschiedener Anreicherungsverfahren (Lyophilisation, Vakuumkonzentrierung, Ultrafiltration) keine kontinuierliche, reproduzierbare Konzentrationssteigerung der XT in der Probe meßbar war. Bei der Lyophilisation und Vakuumkonzentration wurde die XT-Aktivitätsanreicherung durch die Zunahme der Salzkonzentration in der Probe limitiert. Die Ultrafiltration des XT-haltigen, serumfreien Zellkulturüberstand an Membranen aus nicht-ionischen Polymeren mit einer nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze (NMGT) von 10.000 bzw. an Celluloseacetatmembranen mit einer NMGT von 5.000 führte sogar zur Abreicherung aktiver XT. Unter der Annahme, daß ein niedermolekularer Faktor für die XT-

Aktivität essentiell sein könnte, wurde, um auch die Anreicherung von niedermolekularen Substanzen zu erreichen, die NMGT der Ultrafiltrationsmembran auf 1.000 verkleinert. Mit einer entsprechenden Membran aus regenerierter Zellulose (YM1) konnte schließlich eine über einen großen Bereich stetige, reproduzierbare Anreicherung der aktiven XT durch Ultrafiltration erreicht werden. Weitere Untersuchungen zeigten aber, daß nicht ein niedermolekularer Faktor für die erfolgreiche Aufkonzentrierung der aktiven XT in diesem System ausschlaggebend war, sondern die Oberfläche der Ultrafiltrationsmembran mit einem besonders niedrigen Proteinbindungsvermögen.

Die XT kann bis heute nur durch ihre Enzymaktivität detektiert werden, so daß als Isolierungs- und Reinigungsschritte für das Enzym nur native Methoden eingesetzt werden können. Um das Spektrum der Methoden zur Aufreinigung der XT um denaturierende Schritte zu erweitern, wurde versucht die XT durch Affinitätsmodifikation mit einer fluoreszierenden Gruppe zu markieren. Hierbei wurde die räumliche Nähe zwischen der XT und dem Xyloseakzeptor genutzt, um in einer photoinduzierten Insertionsreaktion den an den Akzeptor gebundenen bifunktionellen *Crosslinker* SAED an die XT zu binden. Unter Ausnutzung der Biotinfunktion des Akzeptors sollte zudem eine zur Sequenzierung der XT ausreichende Menge der *Crosslinker*-XT-Akzeptorverbindung an einer Avidinsäule abgetrennt werden. Der *Crosslinker* konnte an das Peptid Biot-QEEEGSGGGQKK-amid gebunden werden, ohne daß die XT-Akzeptoreigenschaften des Peptids verloren gingen. Durch RP-HPLC konnte das Syntheseprodukt aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und im Enzymaktivitätstest als geeignetes Substrat für die XT eingesetzt werden. Allerdings war die nachfolgende photoinduzierte Insertionsreaktion sehr verlustreich, so daß dieser Weg zur Isolierung der XT nicht weiter verfolgt wurde. Diese *Crosslinker*-Strategie zeigt jedoch eine Alternative mit der auf ähnliche Weise andere Enzyme vielleicht erfolgreich isoliert werden können.

Für die Isolierung der XT wurden konventionelle Reinigungsmethoden mit der Proteinaufreinigung an neu entwickelten Affinitätsmatrizes miteinander kombiniert. Heparin wurde als Affinitätsligand für die XT eingesetzt, da die sehr starke Inhibierung der XT-Aktivität durch Heparin [74] auf eine starke Wechselwirkung zwischen diesem Glykosaminoglykan und dem Enzym schließen läßt. Bei der Chromatographie zeigte sich die hohe Affinität der XT zum Heparin in der vollständigen Adsorption des Enzyms an den Liganden. Das hatte den Vorteil, daß kontaminierende Proteine problemlos von der Säule gewaschen werden konnten, da es erst bei relativ hohen Salzkonzentrationen zur Desorption der XT kam. Da niedrige Salzkonzentrationen in der Probe die Aufreinigung der XT an einer Heparinmatrix nicht stören, konnte dieser Aufreinigungsschritt direkt nach der Ammoniumsulfatfällung

durchgeführt werden. Die starke Affinität der XT zum Heparin läßt auf eine Heparin-bindungsstelle des Enzyms schließen.

Die Wechselwirkung der XT mit Protaminchlorid wurde untersucht, da diese argininreichen Proteine bekannte kationische Aktivatoren für diverse Sulfotransferasen sind [75-78]. Hierbei zeigte sich eine relativ starke Adsorption der XT an eine zu diesem Zweck hergestellte Protaminchlorid-Affinitätsmatrix. Die Affinität der XT zu dieser Matrix führte zu einer 13fachen Aufreinigung des Enzyms und stellte damit den effektivsten Reinigungsschritt während der Isolierung der XT dar.

Immobilisiertes Aprotinin, ein Kunitz-Typ Proteinase-Inhibitor, wurde als weiterer geeigneter Affinitätsligand zur Aufreinigung der XT gefunden. Da die XT von einer Aprotinin-Affinitätsmatrix quantitativ adsorbiert wurde, konnte sie zur alternativen Aufreinigung des Enzyms eingesetzt werden. Bikunin, der bisher beste Xyloseakzeptor der XT, ist ebenfalls ein Kunitz-Typ Proteinase-Inhibitor. Möglicherweise erkennt die XT den Xyloseakzeptor nicht nur aufgrund der postulierten Erkennungssequenz [65], sondern auch aufgrund der dreidimensionalen Kunitz-Struktur des Akzeptors, denn obwohl Aprotinin diese Erkennungssequenz nicht besitzt, zeigt es starke Affinität zur XT.

Daß es sich bei dem isolierten Protein tatsächlich um die gesuchte XT handelt, zeigen die unterschiedlichen immunologischen Untersuchungen. Zum Beispiel war mit Antikörpern gegen ein synthetisches Peptid, das von der Aminosäuresequenz des isolierten 120 kDa-Proteins abgeleitet wurde, eine effektive XT-Anreicherung möglich. Mit dem gleichen Antikörper konnte die XT durch eine Immunaффinitäts-Chromatographie kompetitiv eluiert werden. Andere Antikörper, die ebenfalls gegen das isolierte 120 kDa-Protein gerichtet waren, inhibierten die XT-Aktivität um etwa 50 %. Die Immunoblot-Analyse der aprotininaffinitätsgereinigten XT korrelierte mit dem isolierten Protein.

### **5.3 Charakterisierung der Xylosyltransferase**

Entgegen früheren Untersuchungen ist die XT bemerkenswerte stabil. Das Enzym ist im gefrorenem Zustand bei minus 20°C über Monate ohne merklichen Aktivitätsverlust haltbar, selbst bei RT konnte nach mehreren Tagen keine starke Aktivitätsminderung festgestellt werden. Frühere Untersuchungen gehen davon aus, daß die Stabilität der XT mit zunehmender Aufreinigung abnimmt [66]. Genauere Untersuchungen zeigen aber, daß die Ursache für den Aktivitätsverlust bei größerer Reinheit der XT nicht in der Abnahme der

Enzymstabilität liegt, sondern in der zunehmenden unspezifischen Adsorption des Proteins an Gefäßoberflächen.

In einem pH-Bereich von 5 bis 10 ist die XT für pH-Änderungen relativ unempfindlich. Einen stärkeren Einfluß auf die XT-Aktivität hat hier die Wahl des Puffers. Phosphatpuffer führt im Gegensatz zu Acetatpuffer oder Tris/HCl zu einem größeren XT-Aktivitätsverlust. Das ansonsten außergewöhnlich stabile Enzym ist jedoch relativ empfindlich gegenüber Reduktionsmitteln. Offensichtlich sind intakte Disulfidbrücken für die Enzymaktivität essentiell.

Die durch Kombination verschiedener Reinigungsschritte aus JAR-Zellkulturüberstand isolierte XT zeigt sich im reduzierenden SDS-PAGE als homogene Einzelbande mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Stoolmiller *et al.* [58] bestimmten das gleiche Molekulargewicht für die XT aus Hühnerknorpel durch Gelfiltration an Sephadex G-200. Das Enzym ist offensichtlich ein Monomer, denn die durch native Gelfiltration und reduzierende SDS-PAGE bestimmten Größen des Proteins stimmen überein. Allerdings erscheint bei der nicht-reduzierenden und nichtdenaturierenden Gelfiltrations-Chromatographie ein zusätzlicher XT-Aktivitätspeak bei ca. 500 kDa. Vermutlich ist die XT teilweise mit Proteoglykanen assoziiert. Es ist bekannt, daß die XT zusammen mit Chondroitinsulfat-Proteoglykanen in den extrazellulären Raum sezerniert wird [73]. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß bei der Ionenaustausch-Chromatographie die XT-Aktivität vorwiegend bei zwei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert wird.

Die XT ist offensichtlich ein Glykoprotein, denn behandelt man das Enzym mit N-Glykosidase F, verringert sich das Molekulargewicht des Proteins um ca. 3 %. Die meisten bisher isolierten Glykosyltransferasen sind Glykoproteine, die einen Kohlenhydratanteil von bis zu 15 % besitzen.

Ein Vergleich des Molekulargewichts der XT mit dem der anderen Glykosyltransferasen, die an der Biosynthese der Proteoglykanen beteiligt sind, zeigt, daß die XT etwa doppelt so groß ist wie die anderen Enzyme. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß nahezu alle Proteoglykan-Glykosyltransferasen fest an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden sind, die XT aber in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Größe und Sekretion des Enzyms in den Extrazellulärraum lassen vermuten, daß die XT noch an weiteren biochemischen Prozessen beteiligt ist. Eine Phosphorylierung des C<sub>2</sub>-Atoms der Xylose wurde sowohl in Chondroitinsulfat- [86] als auch in Heparansulfat-Proteoglykanen [87] gefunden. Die Xylose ist in Proteoglykanen i. a. nicht phosphoryliert [88, 89], da die



Bindung des ersten Glucuronsäurerestes von einer schnellen Dephosphorylierung der Xylose gefolgt wird [90]. Möglicherweise ist die XT in diesen Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsprozeß involviert. Die Funktion der Phosphorylierung der Xylose ist noch unbekannt, aber möglicherweise liefert sie das Signal für den sekretorischen Transport der Proteoglykane [90, 91].

Die XT benötigt, ähnlich wie andere Glykosyltransferasen, divalente Metallkationen für die Enzymaktivität. Am effektivsten für die XT-Aktivität sind Mangan und Magnesium [92, 93]. EDTA, ein Komplexierungsmittel für divalente Kationen, zeigte aber nur einen relativ geringen Einfluß auf die XT-Aktivität. Vermutlich werden die Metallkationen von der XT sehr fest gebunden, so daß das Entfernen von divalenten Kationen aus der Proteinlösung durch EDTA nicht direkt zur Dissoziation der XT gebundenen Metallkationen führt.

Glykosyltransferasen besitzen weder auf Nukleinsäure- noch auf Proteinebene homologe Bereiche. Allerdings konnte bei vielen Glykosyltransferasen ein DXD Motiv (D = Aspartat, X = beliebige Aminosäure) gefunden werden [24, 94, 95]. Neuere Theorien gehen davon aus, daß dieses Motiv in die Bindung der Metallionen-Kofaktoren sowie in die des Donatorsubstrats involviert ist [96]. Eine DXD Sequenz wurde auch in einem der Peptide (Peptid 8) der enzymatisch gespaltenen XT gefunden. Die Funktion des DXD Motivs der XT könnte eventuell durch *in vitro*-Mutagenese geklärt werden.

Glykosyltransferasen sind hoch spezifisch [19]. Die Akzeptorspezifität der XT resultierte in der Consensus-Sequenz a-a-a-a-G-S-G-a-G/a-a (a = saure Aminosäure (D/E)) als Erkennungsstelle für die Xylosylierung des Serins im Proteoglykan Core-Protein [65, 66]. Der bisher beste Akzeptor für die XT ist die rekombinant hergestellte Variante des Bikunins [ $V^{36}, V^{38}$ ] $^{\delta 1}$ , [ $G^{92}, I^{94}$ ] $^{\delta 2}$  Bikunin, mit einer Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von 0,6  $\mu M$  [66].

Auf der Suche nach weiteren XT-Substraten wurde ein vom Fibroblastenwachstumsfaktor (*Fibroblast growth factor* (FGF-b)) abgeleitetes Peptid ( $K_m = 25 \mu M$ ) als moderater Xyloseakzeptor gefunden. Deshalb ist anzunehmen, daß auch dieser sehr bedeutsame Wachstumsfaktor, der sowohl die Transformation und Proliferation als auch die Genexpression spezifischer Matrixproteine beeinflusst [97], von der XT xylosyliert werden kann.

Die Affinität der XT zum Donatorsubstrat UDP-Xylose ( $K_M = 0,059 \mu M$ ) ist deutlich größer als zu Akzeptorsubstraten [66]. Um die bedeutenden Strukturmerkmale des Xylosedonators zu bestimmen, wurden Untersuchungen strukturell verwandter Verbindungen durchgeführt. Alle

Strukturmerkmale der UDP-Xylose, der Ribosering, die Pyrimidinbase Uridin, die Diphosphatgruppe und auch der Zucker Xylose, waren zur Erkennung für die XT von Bedeutung. Allerdings reichten ein (z. B. Ribose) oder zwei Strukturmerkmale (z. B. Uridin) für eine effektive Wechselwirkung mit der XT nicht aus. Die hohe Spezifität der XT zum Donatorsubstrat wurde insbesondere dadurch deutlich, daß der Austausch des zu übertragenden Zuckers im Substrat zu einer drastischen Verringerung der Wechselwirkung zwischen der XT und dem UDP-Zucker führte.

## 5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Teile der Primärsequenz der humanen XT entschlüsselt und Anti-XT-Antikörper hergestellt. Auf der Basis dieser Sequenzdaten konnte bereits ein großer Teil der XT-cDNA unter Verwendung degenerierter Oligonukleotid-Primer kloniert werden [79].

Mit der vorliegenden Arbeit ist jetzt die Grundlage zur Charakterisierung der Genorganisation und Genexpression der XT geschaffen. Darüber hinaus eröffnen die hier gewonnenen Erkenntnisse jetzt die Möglichkeit, das Protein für die Funktionsanalyse durch rekombinante Darstellung in großen Mengen herzustellen. Durch *in vitro*-Mutagenesen könnte z. B. die Bindungsstelle für das Akzeptorprotein und für die UDP-Xylose identifiziert werden. Im Vordergrund steht die Überprüfung des sogenannten DXD-Motivs, das für einige Glykosyltransferasen als UDP-Zucker-Bindungsstelle diskutiert wird und das auch in der XT-Sequenz vorhanden ist. Die offensichtlich vorhandene Heparin-Bindungsstelle der XT könnte auf ähnliche Weise identifiziert werden. Für die biologische Aktivität sind posttranslationale Modifikationen oft äußerst wichtig. Eine chemische Analyse der XT kann jetzt helfen die Art dieser Veränderungen aufzuklären. Die Suche nach humanen Isoformen des Enzyms sowie die Identifizierung der XT in anderen Spezies kann jetzt durchgeführt werden. Ausgehend von den ermittelten Teilsequenzen unter Verwendung degenerierter Oligonukleotid-Primer wurde eine erste Isoform mit 80 % Homologie zum isolierten Enzym bereits gefunden [79].

XT-Defizienzen sind bisher unbekannt. Höchstwahrscheinlich ist ein Totalausfall der XT schon in der Embryonalphase letal, XT-Polymorphismen, die zu veränderten Eigenschaften des Enzyms führen, sind denkbar. Die Suche nach Punktmutationen im XT-Gen könnte daher diese interessante Frage beantworten. Bindegewebserkrankungen, die auf solchen XT-Polymorphismen beruhen, können dann aufgeklärt werden.

Für den quantitativen Nachweis der XT in Körperflüssigkeiten eröffnen jetzt Anti-XT-Antikörper die Möglichkeit der Entwicklung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens als Ersatz für den zur Zeit etablierten radiochemischen XT-Test. Ein solcher XT-Enzymimmunoassay hätte die Vorteile einer schnellen und leichten Testdurchführung sowie die Möglichkeit der Messung großer Serien. Neben der bereits jetzt möglichen Quantifizierung gewebespezifischer XT-Transkriptionsprodukte durch die quantitative PCR kann mit Hilfe der Anti-XT-Antikörper das Vorkommen des Enzyms in unterschiedlichen Geweben und Organen bestimmt werden. Mit goldmarkierten Anti-XT-Antikörper wäre die elektronenmikroskopische Detektion der XT in Geweben, Zellen und Zellkompartimenten möglich. Damit ließe sich das Verteilungsmuster der XT in Zellen nachweisen und auch der Sezernierungsprozeß des Enzyms in den Extrazellulärraum verfolgen.

Im Gegensatz zu anderen bekannten Glykosyltransferasen wird die XT in den extrazellulären Raum sezerniert. Die aktive Sezernierung und das im Vergleich zu anderen Glykosyltransferasen außergewöhnlich hohe Molekulargewicht lassen vermuten, daß es sich bei der XT um ein multifunktionelles Enzym handelt. Die Aufklärung der Funktion der intra- bzw. extrazellulären XT könnte Aufschluß darüber geben.

Aufgrund der aktiven Sezernierung läßt sich die XT im Serum wiederfinden und quantifizieren und kann so eventuell in der klinisch chemischen Diagnostik als Parameter bei verschiedenen Bindegewebserkrankungen dienen. Bereits früher wurde beschrieben, daß es bei diversen Gelenkerkrankungen zu einer drastischen Zunahme der XT-Aktivität in der Synovialflüssigkeit kommt [74]. In jüngster Vergangenheit erwies sich die XT als ein neuer diagnostischer Serum-Marker für sklerotische Prozesse bei systemischer Sklerose [73, 74]. Tumorzellen wie z. B. die JAR Choriokarzinomzellen sezernieren ungewöhnlich große Mengen XT in den extrazellulären Raum. Möglicherweise läßt sich die XT-Aktivität bzw. XT-Konzentration im Patientenserum als diagnostische Kenngröße z. B. als Tumormarker in Zukunft nutzen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Bestimmung des Proteingehalts in Flüssigkeiten

Die Proteinkonzentration in Flüssigkeiten wird mit dem *Bicinchoninsäure-(BCA)-Proteinassay* nach Pierce bestimmt [98]. Bei chromatographischen Verfahren wird sie durch Extinktion der mobilen Phase bei 220 nm bzw. 280 nm gemessen.

### 6.2 Xylosyltransferase-Aktivitätstest

Der Test zur Quantifizierung der Xylosyltransferase-Aktivität beruht auf der Bestimmung der XT-katalysierten Menge eingebauter radioaktiver Xylose in das Substrat [65].

#### 6.2.1 Präparation des Akzeptors Seidenfibroin

Das im XT-Test als Substrat verwendete Seidenfibroin des Seidenspinners *Bombyx mori* hat die repetitive Sequenz (GSGAGA)<sub>n</sub> [99]. Um das Seidenfibroin in eine zur Xylosylierung geeignete Form zu überführen, wird die Seide nach einer beschriebenen Methode [74] mit LiSCN solvatisiert, anschließend werden die Salze durch Dialyse abgetrennt, und schließlich wird das 1 %ige Seidenfibroin-Dialysat mit 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 äquilibriert. Das hierbei erhaltene Substrat ist bei RT ca. 24 h, bei -70°C ca. 12 Monate stabil.

#### 6.2.2 Darstellung der Akzeptoren Bikunin und [<sup>36</sup>V,<sup>38</sup>V]<sup>δ1</sup>, [<sup>92</sup>G,<sup>94</sup>I]<sup>δ2</sup>Bikunin

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes BL21 (DE3) [Genotyp: E. coli B F, Omp T, R<sub>B</sub><sup>-</sup>, M<sub>B</sub><sup>-</sup>, DE3], der die codierende DNA-Sequenz für Bikunin in einem pET 15 b-Expressionsvektors enthält, wird wie unter 6.4.2 beschrieben kultiviert und das Expressionsprodukt wie dort beschrieben aufgereinigt. Der Akzeptor [<sup>36</sup>V,<sup>38</sup>V]<sup>δ1</sup>, [<sup>92</sup>G,<sup>94</sup>I]<sup>δ2</sup>Bikunin wird analog hergestellt.

### 6.2.3 Radioaktiver Aktivitätstest

Der 100 µl-Reaktionsansatz enthält 50 µl Probenmaterial, 30 µl Akzeptorsubstrat (3 µM Akzeptor), 50 mM MES (pH 6,5), 0,5 µM UDP-[<sup>14</sup>C]Xylose, 50 mM KCl, 10 mM KF, 10 mM MnCl<sub>2</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wird der Ansatz auf eine Nitrozellulosemembran (Ø 25 mm) pipettiert und 2 h bei RT getrocknet. Dann wird die Membran einmal 10 min mit 10 %iger und dreimal 10 min mit 5 %iger TCA gewaschen. Zur Bestimmung der in den Akzeptor eingebauten Menge radioaktiver Xylose wird die Membran mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

## 6.3 Untersuchung der Eigenschaften der Xylosyltransferase

### 6.3.1 Chemische und physikalische Einflußgrößen

Als xylosyltransferasehaltiges Material wird für die folgenden Untersuchungen sterilfiltrierter (Porengröße des Sterilfilters: 0,2 µm), durch Ultrafiltration teilweise aufkonzentrierter JAR-Choriokarzinom-ZKÜ (pH 7,0) verwendet.

Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die XT-Aktivität wird durch die Einstellung unterschiedlicher pH-Werte mit 0,1 M Natriumacetat, 0,1 M PBS und 0,1 M Tris/HCl untersucht. Zur Untersuchung der Empfindlichkeit der XT gegen Oxidation wird die Probe 1 h mit 50 mM KMnO<sub>4</sub> bei 37°C inkubiert. Die Reduktionsempfindlichkeit der XT wird durch 1h Inkubation der Probe bei 37°C mit 50 mM 2-Mercaptoethanol getestet.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Detergentien auf die XT-Aktivität wurde unterhalb der kritischen Micellenkonzentration geblieben. XT-Proben wurden mit 0,01 % (w/v) bzw. mit 0,02 % (w/v) Triton X-100, mit 0,001 % (w/v) bzw. 0,002 % (w/v) Tween 20 oder mit 0,7 % (w/v) bzw. 1,4 % (w/v) CHAPS versetzt und im XT-Test gemessen.

Da Ethanol eventuell als Konservierungsmittel sowohl für die Lagerung des ZKÜ als auch bei der Aufkonzentrierung der XT (Ultrafiltration), als potentielles Fällungsmittel oder als Elutionsmittel bei der Chromatographie dienen könnte, wurde die Beeinflussung der XT-Aktivität durch Ethanol untersucht. Dazu wurde die XT-Aktivität von XT-Proben mit unterschiedlichem Ethanolgehalt bestimmt. Eine analoge Testreihe wurde mit Acetonitril durchgeführt.

### 6.3.2 Synthese von potentiellen XT-Inhibitoren

Die Darstellung von Dialdehyden als potentielle XT-Inhibitoren erfolgt durch oxidative Periodatspaltung der vicinalen Hydroxylgruppen des Riboseringes der eingesetzten Verbindungen in Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene Methode [100]. Hierbei werden 10 mM der zu spaltenden Verbindung mit 10 mM NaIO<sub>4</sub> im Dunkeln bei RT umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min. Folgende Verbindungen werden auf diese Weise oxidiert und in die entsprechenden Dialdehyde überführt: Uridin, UMP, UDP, UTP, UDP-Xylose, UDP-Galactose, Cytidin, CDP und Ribose.

### 6.3.3 Bestimmung der inhibitorischen Wirkung

Die unter 6.3.2 aufgeführten Verbindungen bzw. die synthetisierten Dialdehyde dieser Verbindungen sowie Pyridoxalphosphat werden einzeln dem XT-Test (siehe 6.2.3) in einer Konzentration von 2,5 mM zugesetzt. Als XT-Probe dient hierbei 25 µl 100fach aufkonzentrierter JAR-Zellkulturüberstand, so daß die Inkubationszeit des Tests auf 5 min reduziert werden kann. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln. Da die Dialdehyde als Kontamination noch Periodat bzw. Iodat enthalten, wird Xylose analog wie unter 6.3.2 beschrieben mit NaIO<sub>4</sub> oxidiert und die daraus resultierenden Reaktionsprodukte dienen dann im XT-Test als Referenz für die im Test eingesetzten Dialdehyde.

### 6.3.4 N-Glykosidase F-Abbau

Eine Aliquot (1 µg) isolierter XT wird mit  $3,1 \cdot 10^{-3}$  U N-Glykosidase F 1 h bzw. 12 h bei 37°C inkubiert. Die Probe wird anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

## 6.4 Zellkultur

### 6.4.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Eukaryontische Zellen werden in sterilen Zellkulturflaschen bei 37°C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-/95 %igen Luftatmosphäre bei 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Allen Zellkulturmedien werden 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 250 ng/ml Amphotericin B zugesetzt. Im übrigen erfolgt die Kultivierung der Zellen nach den Empfehlungen des Datenblattes der entsprechenden Zelllinie. Die benutzten Zellkulturmedien und der jeweilige Zusatz von FCS für die entsprechenden Zelllinien sind im folgenden aufgeführt:

- RPMI 1640 mit 10 % FCS: A-431 (human, Epidermoidkarzinom), MHH-ES-1 (human, Ewing's Osteosarkom), SAOS-2 (human, Osteogenicsarkom), SW 982 (human, Synovialsarkom), WERI-RB-1 (human, Retinoblastom), JAR (human, placenta, Choriokarzinom)
- RPMI 1640 mit 20 % FCS: BM-1604 (human, Prostatakarzinom), Y 79 (human, Retinoblastom)
- Medium 199 mit 10 % FCS: RPMI 2650 (human, Nasalseptumkarzinom), SAOS-2 (human, Osteogenicsarkom), SW 1353 (human, Chondrosarkom)

Außerdem wird eine serumfreie Kultivierung einiger oben genannter Zellen in serum- und proteinfreiem Hybridoma- bzw. Ultradoma-Medium durchgeführt. JAR-Zellen werden zudem serumfrei unter Zusatz von 10 µg/ml Insulin und 10 µg/ml Transferrin kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 6.4.1.1 Passagieren von adhärennten Zellen

Bevor die Kultur konfluent ist, werden die Zellen zur Vermeidung einer Kontaktinhibition passagiert. Dazu wird zunächst der Zellkulturüberstand abgehoben, und die abgestorbenen Zellen werden mit ca. 10 ml PBS entfernt. Anschließend werden die vitalen Zellen mit 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt, 8-10 min bei 37°C inkubiert und durch Spülen mit einer Pipette von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellsediment dreimal mit je 10 ml Zellkulturmedium gewaschen. Schließlich werden die Zellen durch leichtes Schütteln in 10 ml Zellkulturmedium re-

suspendiert und erneut ausgesät. Alle beim Passagieren der Zellen verwendeten Lösungen werden auf 37°C vorgewärmt.

PBS:                            0,8 % NaCl  
                                     0,115 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5  
                                     0,02 % KCl  
                                     0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Trypsin-EDTA-Lösung:    PBS  
                                     0,5 g/l Trypsin  
                                     0,2 g/l EDTA

#### **6.4.1.2 JAR-Zellen**

Choriokarzinomzellen der Zelllinie ATCC HTB-144 (human, Placenta, Choriokarzinom) sind schnell wachsende Zellen, die Xylosyltransferase in relativ großen Mengen sezernieren. Sie werden deshalb zur Produktion des Ausgangsmaterials für die Proteinaufreinigung kultiviert.

#### **6.4.1.3 Rollerkulturflaschen**

Für die Kultivierung der JAR-Zellen werden glatte COSTAR-Rollerflaschen mit einer Länge von 233 mm, einem Durchmesser von 123 mm und einer Wachstumsfläche von 900 cm<sup>2</sup> verwendet. Eine Steigerung der XT-Produktion erfolgt durch den Einsatz von FALCON-Rollerflaschen mit gefalteter Oberfläche (Länge: 280 mm, Durchmesser: 115 mm, Wachstumsfläche: 1750 cm<sup>2</sup>). In die Rollerkulturflaschen wird jeweils 0.5 l Ultradoma-Medium eingefüllt. Pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche werden ca. 2\*10<sup>4</sup> JAR-Zellen eingesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luft und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit bei 37°C und einer Rollgeschwindigkeit von 0,1 U/min. Sobald der Glucosegehalt des Zellkulturmediums unter 2,8 mmol/l gesunken ist, wird der Überstand geerntet und durch neues Ultradoma-Medium ersetzt.



#### 6.4.1.4 Spinnerkultivierung

Die Kultivierung der JAR-Zellen erfolgt in einer 1,0 l Duran-Flasche (Schott), die im Zentrum einen aus einer Spezialmembran aufgebauten und frei aufgehängten Rührer enthält. Die Spezialmembran des Rührers erlaubt einen blasenfreien Gasaustausch (5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luft), der im sanft gerührten Medium den pH-Wert der Zellkultur stabilisiert (Superspinner). Nach dem Zusammenbau wird der Superspinner 20 min bei 121 °C und 1,0 bar Überdruck autoklaviert.

Um das Anhaften von Mikroträger-Kügelchen (*Microcarrier*) bzw. JAR-Zellen an Glasoberflächen zu vermeiden, werden alle Glasgeräte vor ihrem Einsatz silanisiert. Eine zur Silanisierung geeignete 4 %ige Silanlösung erhält man durch Vermischen von 1,0 ml Dimethyldichlorsilan mit 24 ml Tetrachlorkohlenstoff. Damit werden alle relevanten Glasoberflächen drei- bis viermal benetzt und nach dem Trocknen 1 h auf 70°C erhitzt. Nachdem die Glasgeräte abgekühlt sind, werden sie, um restliche Verunreinigungen zu entfernen, mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen.

Durch den Einsatz von Mikroträgern sollte die Zahl der adhärennten JAR-Zellen pro Volumeneinheit und damit die produzierte XT-Menge pro Zeiteinheit erhöht werden. Als Träger-substanz dient hierbei Cytodex 3. Zum Quellen werden 3,0 g dieser *Microcarrier* über Nacht in 75 ml PBS geschüttelt. Anschließend werden sie dreimal mit CMF-PBS gewaschen, wobei der Überstand jeweils nach dem Absetzen der *Microcarrier* abdekandiert wird. Danach wird mit CMS-PBS auf 75 ml aufgefüllt und die Suspension 20 min bei 121 °C und 1,0 bar Überdruck autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wird der CMF-PBS-Überstand abdekandiert und die *Microcarrier* werden mit 100 ml serum- und proteinfreiem Hybridoma-Medium versetzt. Die dadurch entstandene Suspension wird über Nacht in 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luft bei 37 °C geschüttelt.

Zur Kultivierung der JAR-Zellen wird der Superspinner mit 300 ml Hybridoma-Medium gefüllt. Dazu werden 70 ml der *microcarrier*-Suspension gegeben, und das Gemisch wird anschließend 1 h unter 5 %iger CO<sub>2</sub>-/95 %iger Luftdurchströmung bei 37°C mit 30 U/min gerührt. Dann werden  $1,85 \cdot 10^7$  Choriokarzinom-Zellen eingesät, und die hierbei entstandene Suspension wird unter 5 %iger CO<sub>2</sub>-/95 %iger Luftbegasung bei 37°C im Intervall (2 min Rühren, 30 min Pause) mit 30 U/min gerührt. Nach 6 h wird der Rührer auf Dauerbetrieb umgeschaltet und nach weiteren 72 h der Superspinner mit Hybridoma-Medium auf 800 ml aufgefüllt. Sobald der Glucosegehalt des Zellkulturmediums unter 2,8 mmol/l gefallen ist, wird das Medium gewechselt.

In gleicher Weise erfolgt die Kultivierung der JAR-Zellen im Superspinner mit RPMI 1640 als Medium, das 10 % FCS enthält.

#### **6.4.1.5 3-D-Kultivierung**

Die größten Zelldichten und damit das meiste Zellprodukt erhält man zweifellos durch dreidimensionales Zellwachstum. Durch die Anwendung der Hohlfasertechnologie in dem modular aufgebauten (bis zu fünf Kulturkassetten pro System), kompartimentierten Zellkultursystem TECNOMOUSE, in dem Gas-, Kultivierungs- (Extrikapillarraum = EC) und Nährstoffversorgungsraum (Intrakapillarraum = IC) durch gasdurchlässige Silikonmembranen bzw. durch die für niedermolekulare Komponenten permeablen Cuprophan-kapillaren (NMGT = 10 kDa) getrennt sind, wird versucht, mit JAR-Zellen gewebeähnliche Strukturen aufzubauen. Dazu werden  $10^8$  Choriokarzinomzellen aus konventioneller Zellkultivierung in 10 ml serumfreien Hybridoma- oder Ultradomamedium suspendiert und in den ca. 12 ml fassenden EC einer Kulturkassette inokuliert. Die Zufuhr von Nährstoffen bzw. die Abfuhr von niedermolekularen Stoffwechselendprodukten erfolgt über die den EC durchspannenden Hohlfasern (IC) durch Zirkulation von 2 l, 5 l oder 10 l protein- und serumfreien Hybridoma- oder Ultradomamediums, dem 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 250 ng/ml Amphotericin B zugesetzt sind. Die Durchflußgeschwindigkeit wird auf 150 ml/h eingestellt. Das Versorgungsmedium wird gewechselt, sobald seine Glucosekonzentration im EC unter 2,8 mmol/l fällt oder sein Lactatgehalt über 15 mmol/l ansteigt. Eine homogene O<sub>2</sub>- bzw. CO<sub>2</sub>-Versorgung der Zellen wird durch aktive Begasung des Kultivierungsraums mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem 5 %igem CO<sub>2</sub>-/95 %igem Luftgemisch über gasdurchlässigen Silikonmembranen, die apikal und basal den Zellen angelagert sind, sichergestellt. Die Zellkultivierung erfolgt bei 37° C.

Zur Entnahme der extrazellulären Proteine wird mit der Kanüle (0,90 x 40 mm) einer leeren 10 ml-Einwegspritze das Septum eines der drei Ernteports der Kulturkassette durchstoßen und die Spritze so langsam aufgezogen, daß sich ein Druckausgleich über langsames Nachströmen des Mediums durch die permeablen Kapillaren einstellen kann.

#### **6.4.1.6 Bestimmung der Zellzahl**

Von vitalen Zellen werden bestimmte Farbstoffe wie z.B. Trypanblau nicht aufgenommen. Die Zellwand abgestorbener Zellen ist aber für diese Farbstoffe permeabel. Eine Aliquot Zellsuspension wird mit einem Aliquot 0,2 %iger Trypanblau-Lösung gut gemischt und die

Lebendzellzahl (Zahl der ungefärbten Zellen) unter einem Phasenkontrastmikroskop in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Aus der 1:1 Verdünnung der Probe mit der Farbstofflösung und dem Volumen der Neubauerkammer von  $0,1 \text{ mm}^3$  ergibt sich die Anzahl der Zellen pro ml wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = 2 * 10^4 * \text{Zellzahl}$$

Die Zellzahl gibt hierbei die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro ausgezählter  $1,0 \text{ mm} * 1,0 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm}$  Neubauerkammer an, wenn mehrere Kammern ausgezählt werden.

#### 6.4.1.7 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Zur Konservierung von Zellen wird einer Aliquot Zellsuspension ein Aliquot Einfriermedium (FCS / 10 % DMSO) zugesetzt und gut vermischt. Die hierbei entstandene Suspension wird in einem Kryoröhrchen langsam auf  $-70^\circ\text{C}$  abgekühlt ( $1^\circ\text{C}$  pro 10 min) und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Im Gegensatz zum Einfrieren geschieht das Auftauen rasch in einem  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad.

#### 6.4.1.8 Analyse des Zellkulturüberstandes

Die Glucose-, Lactat- und Aminosäurebestimmung des Zellkulturüberstandes erfolgt vollautomatisch nach standardisierten Verfahren. Proteingehalt und Xylosyltransferase-Aktivität im Überstand werden wie unter 6.1 bzw. 6.2 beschrieben bestimmt, wobei vor der Proteinkonzentrationsbestimmung eine Abtrennung der Aminosäuren durch Diafiltration an einer Ultrafiltrationsmembran mit einer NMGT von 3000 (YM3) durchgeführt wird.

#### 6.4.2 Kultivierung von Bakterien

Das Darmbakterium *E. coli* wird zur biotechnischen Produktion des rekombinanten Proteins Bikunin und der Bikunin-Variante  $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$  eingesetzt. Die hierfür verwendeten Klone des Bakterienstammes BL21 (DE3) [Genotyp: *E. coli* B F<sup>-</sup>, Omp T, R<sub>B</sub><sup>-</sup>, M<sub>B</sub><sup>-</sup>, DE3] tragen die Bikunin- bzw.  $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$  Bikunin-codierende DNA-Sequenz in einem pET 15 b Expressionsvektor, dessen  $\beta$ -Laktamase-Gen den Bakterien eine Ampicillinresistenz verleiht und damit die Selektion plasmidtragender Klone ermöglicht. Als Expressionsprodukt

entsteht ein Fusionsprotein mit einer N-terminalen *Leader*sequenz mit sechs Histidinresten und einer Thrombinspaltstelle. Das rekombinante Protein kann dadurch an einer Nickelchelatsäule effektiv aufgereinigt werden.

#### 6.4.2.1 Anzucht und Vermehrung von *E. coli*

Zu 15 ml LB-Amp-Medium werden 4  $\mu$ l Bakteriensuspension der zu vermehrenden Einzelkolonie gegeben und das angeimpfte Medium in einem Rollinkubator über Nacht bei 37°C inkubiert. Die ÜN-Kultur kann einige Tage bei 4°C gelagert werden.

LB-Medium:            1,0 % NaCl  
                             1,0 % Trypton  
                             0,5 % Hefeextrakt

LB-Amp-Medium:    LB-Medium mit 0,02 % Ampicillin

Zur weiteren Vermehrung werden die Zellen der ÜN-Kultur 5 min bei 3000 *g* abzentrifugiert, das hierbei entstehende Bakteriensediment in 150 ml LB-Amp-Medium resuspendiert und die Suspension anschließend 2 h im Brutschrank unter mäßigem Schütteln bei 37°C inkubiert.

#### 6.4.2.2 Induktion der Proteinexpression

Die aus der Vermehrung (6.4.2.1) hervorgegangenen Bakterien werden sedimentiert und in 750 ml LB-Amp-Medium resuspendiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension unter kräftigem Schütteln bei 37°C bis zu einer  $OD_{560} \approx 0,7$  inkubiert. Die für die Schüttelinkubation verwendeten Gefäße sollen nur zu etwa 1/10 ihres Volumens mit Flüssigkeit gefüllt sein. Nach Erreichen einer  $OD_{560} \approx 0,7$  wird die Proteinexpression durch Zugabe von 300  $\mu$ l 1 M IPTG-Lösung induziert. Danach wird weitere 4 h bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert und zur Expressionskontrolle stündlich 1 ml Probe entnommen. Die Bakterien der Probe werden abzentrifugiert (5 min, 13000 *g*), der Überstand verworfen, das Zellsediment in 200  $\mu$ l Laemmli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 100°C inkubiert. Die so hergestellten Proben werden in einer SDS-PAGE eingesetzt (siehe 6.6.2).

IPTG-Lösung:            1M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid

---

Laemmli-Puffer:	125 mM Tris/Glycin, pH 8,6
	250 mM Saccharose
	4 % SDS
	1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
	0, 1% Bromphenolblau

### 6.4.2.3 Lösen und Reinigen des Expressionsprodukts

In den Bakterien ist das Expressionsprodukt in Form von *Inclusion bodies* angereichert. Zur Lyse der Bakterien wird pro g Bakteriensediment (siehe 6.4.2.2) 50 ml Aufschlußpuffer zugegeben. Dann werden die Bakterien resuspendiert. Anschließend gibt man 0,3 mg Lysozym pro ml Suspension zu, schüttelt 30 min bei 37°C und mischt danach 10 min auf Eis kräftig durch. Die hierbei entstandene Suspension wird 30 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 2mal mit 20 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Lösen der *inclusion bodies* erfolgt nach Resuspendieren des Pellets in 200 ml Denaturierungspuffer durch 1 h schütteln bei 50°C. Anschließend wird die Lösung 30 min bei 10000 g zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand 3 Tage gegen 40 mM Tris/HCl, pH 8,5 dialysiert, wobei das Expressionsprodukt Bikunin bzw. die Bikunin-Variante  $[V^{36}, V^{38}]^{\delta 1}, [G^{92}, I^{94}]^{\delta 2}$  renaturiert.

Die Aufreinigung der beiden Proteine erfolgt mit Hilfe ihrer N-terminalen *Leadersequenz* aus sechs Histidinresten durch Affinitätschromatographie an einer  $Ni^{2+}$ -beladenen Iminodiessigsäure-POROS-Matrix. Dazu wird eine 4,6 mm x 100 mm (1,7 ml) Säule mit POROS MC durch 26 ml 50 mM  $NiCl_2$  bei einer Flußrate von 2 ml/min mit  $Ni^{2+}$  beladen. Anschließend wird die Säule mit 10 Säulenvolumina des Puffers A gespült und dann mit 50 ml dialysiertem Bakterienlysat beladen. Die nicht bindenden Verunreinigungen werden mit 17 ml des Puffers A, die schwach bindenden Verunreinigungen mit 8,5 ml des Puffergemischs aus 5 % Puffer B und 95 % Puffer A von der Säule gespült. Zur Elution der Zielproteine wird für 5 Säulenvolumina die Pufferkonzentration des Puffers B auf 50 % heraufgesetzt. Zur Reinigung wird die Säule 5 min lang mit 100 % Puffer B gespült.

Die Elutionsfraktionen werden im Xylosyltransferase-Test (siehe 6.2.3) und durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese überprüft (siehe 6.6.2). Das NaCl und Imidazol im Eluat der Zielfraktionen werden durch Gelfiltration (Laufmittel: 30 mM PBS, pH 7,4) abgetrennt.

Aufschlußpuffer:	- 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
	- 5 mM Benzamidin-Hydrochlorid
	- 5 mM 2-Mercaptoethanol

---

Waschpuffer:	- Aufschlußpuffer + 1M Harnstoff
Denaturierungspuffer:	- 20 mM Tris/HCl, pH 8,5 - 6 M Harnstoff - 100 mM 2-Mercaptoethanol
Puffer A:	- 20 mM Tris/HCl, pH 8 - 0,5 M NaCl - 5 mM Imidazol
Puffer B:	- 20 mM Tris/HCl, pH 8 - 0,5 M NaCl - 1 M Imidazol

#### 6.4.2.4 Herstellung einer Kryokultur

Die Bakterienzellen von 3 ml ÜN-Kultur werden sedimentiert (Zentrifugation: 5 min, 3000 g), anschließend in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt. Die Probe wird bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 6.5 Untersuchungen zur Aufkonzentrierung des Enzyms

Zur Volumenverminderung und damit besseren Handhabung der Ausgangsprobe, i. a. handelte es sich hierbei um ZKÜ von JAR-Zellen, werden die nachstehende Methoden angewendet. Neben den unten genannten Methoden zur Aufkonzentrierung der XT wird das Enzym bereits während der Kultivierung der JAR-Zellen im EC des Hybridhohlfaser-Bio-reaktors aufgrund dessen spezieller Kompartimentierung angereichert (siehe 4.1.2.3).

#### 6.5.1 Entfernen von flüchtigen Substanzen mit dem Bachhofer Vakuumkonzentrator

Kleinere Proben werden in Mikroreaktionsgefäßen im Vakuumkonzentrator zentrifugiert, dabei werden gleichzeitig die flüchtigen Substanzen durch Unterdruck bei RT entfernt.

### 6.5.2 Gefriertrocknen

Zum Gefriertrocknen werden die Proben auf  $-70^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Danach folgt durch Vakuum die Gefriertrocknung am Lyophilisator.

### 6.5.3 Ultra- und Diafiltration

Je nach Volumen der Probe wird zur Ultrafiltration eine 3 ml, 10 ml, 50 ml oder 400 ml Rührzelle eingesetzt. Die Filtration wird durch Anlegen von 3,7 bar  $\text{N}_2$ -Überdruck und unter Verwendung von Membranen aus regenerierter Cellulose mit einer nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze (NMGT) von 1000 oder 3000 (YM1 bzw. YM3) sowie mit Membranen aus inerten nichtionischen Polymeren mit einer NMGT von 10000 (PM10) mit einer Rührgeschwindigkeit von etwa 100 U/min bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Als weiteres Ultrafiltrationssystem wird der Prototyp einer Spiralzelle in Kombination mit einer Kolbenpumpe eingesetzt. Die Ultrafiltration erfolgt hierbei an einer Celluloseacetatmembrane mit einer NMGT von 5000 bei einem tangentialen Fluß von 20 ml/min und gedrosseltem Retentatflux bei RT.

Niedermolekulare Substanzen (Salzionen, Aminosäuren, Denaturierungsmittel etc.) werden durch Diafiltration entfernt, indem die Proteinprobe in einer Rührzelle an einer YM1-Membran auf 1/10 des Ausgangsvolumens reduziert und anschließend das Ausgangsvolumen durch Zugabe von Wasser oder einem geeigneten Puffer wieder eingestellt wurde. Dieser Vorgang wird je nach Notwendigkeit mehrere Male wiederholt.

Zur Aufkonzentrierung bzw. Entsalzung kleiner Probenvolumina (10  $\mu\text{l}$  - 500  $\mu\text{l}$ ) durch Ultrafiltration eignen sich Mikrokonzentratoren, die mit verschiedenen Ultrafiltrationsmembranen erhältlich sind. *Microcon*-Mikrokonzentratoren enthalten sehr schwach proteinbindende, anisotrope, hydrophile YM-Membranen aus regenerierter Cellulose und besitzen damit ideale Eigenschaften für die Proteinaufarbeitung. Zur Aufkonzentrierung von Proteinproben werden diese in das Probereservoir der *Microcon*-Einheit pipettiert und je nach Probenvolumen mehrere Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wird der Mikro-konzentrator umgekehrt in ein dafür vorgesehenes Auffanggefäß gesteckt und das Retentat (Rückhaltevolumen: 10  $\mu\text{l}$ ) durch 3 min Zentrifugieren bei 10000 g gewonnen. Zum Entsalzen von Proben wird nach dem Zentrifugationsschritt  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. Puffer zum Retentat gegeben, erneut zentrifugiert und zur Gewinnung des Retentats wie oben beschrieben verfahren.

#### 6.5.4 Ammoniumsulfatfällung

Für die Ammoniumsulfatpräzipitation wird der durch Ultrafiltration 50- bzw. 100fach aufkonzentrierte, durch Diafiltration 100fach entsalzte und durch MES (50 mM, pH 6,5) gepufferte JAR-ZKÜ verwendet. Die Konzentrierungs- bzw. Reinigungsmethode wird im Rahmen einer sukzessiven Erhöhung der Ammoniumsulfatsättigungskonzentration und der daraus resultierenden Fällungsergebnisse optimiert. Zur Berechnung der Sättigungskonzentration bei 20°C dient die folgende Gleichung:

$$g = 533 (S_2 - S_1) / (100 - 0,3 S_2)$$

g:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - Zugabe in mg pro ml Probevolumen

$S_1$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - Startkonzentration

$S_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - Endkonzentration



## **6.6 Proteinchemische Untersuchungen der Xylosyltransferase durch elektrochemische Verfahren**

### **6.6.1 Native isoelektrische Fokussierung**

In einem durch 20 permeablen Membranen segmentierten Zylinder des Rotofor-Systems wird die isoelektrische Fokussierung unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgt nach der Fokussierung durch die Messung des pH-Wertes bzw. der XT-Aktivität der durch die Membranen getrennten Fraktionen.

Als Ausgangsmaterial zur Fokussierung dient durch Ultrafiltration fünffach aufkonzentrierter und durch Diafiltration weitgehend entsalzter JAR-Zellkulturüberstand aus serum- und proteinfreier Kultivierung. Zu 50 ml sterilfiltrierter Probe werden 2 ml Glycerin und 2,5 ml 40%ige Bio-Lyte 3/10 Ampholyte gegeben. Die Lösung wird in dem segmentierten Zylinder des Rotofor-Systems verteilt und der Zylinder verschlossen. Nach Einschalten des Systems dreht sich der Zylinder mit ca. 1 U/min um die eigene Achse. Zur Fokussierung wird eine Spannung von 2000 V angelegt. Die Temperatur wird auf 1°C eingestellt, die Stromstärke wird auf 100 mA und die elektrische Leistung auf 12 W begrenzt. Der Fokussierungsvorgang zeigt sich durch den Anstieg der Klemmenspannung. Wenn keine zeitliche Veränderung der Spannung mehr stattfindet, ist die Fokussierung abgeschlossen. Nach 270 min ist dieser Zustand erreicht, und die Fraktionen der einzelnen Segmente werden durch Anlegen von Unterdruck gleichzeitig geerntet. Zur besseren Lokalisierung des isoelektrischen Punktes der XT wird die isoelektrische Fokussierung mit gleichem Ausgangsmaterial, aber mit 2,5 ml 40 %igen Bio-Lyte 6/8 bzw. 5/8 unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt.

### **6.6.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Bei der Hitzedenaturierung von Proteinen in Gegenwart eines Überschusses an SDS und DTT bildet sich ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Im elektrischen Feld trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamidmatrix solche SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius auf, wobei deren Wanderungsgeschwindigkeit logarithmisch von der Molekülgröße abhängt.

Für die analytische Gelelektrophorese ist wegen des geringeren Zeitaufwandes die Verwendung von fertigen Gradientengele (8-25 % Polyacrylamid) am Pharmacia *Phast*

*System* sinnvoll. Bei der Probenvorbereitung werden zu 45 µl Probe 5 µl *Phast*-Puffer gegeben und die Lösung zur Denaturierung der Proteine wird 10 min auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wird zur Acylierung der freien Thiolgruppen 12,5 µl 10 %ige Iodacedamid-Lösung zugegeben, und zur Abtrennung fester Partikel wird die Lösung 2 min bei 13000 g zentrifugiert. Mit einem Probeauftragekamm können zur Elektrophorese 8 × 1 µl Probe auf das Sammelgel des Kleingels (45 × 50 mm) aufgetragen werden. Es ist sinnvoll, zur Abschätzung der Molekularmasse der Probeproteine den ersten und den achten Zahn des Probeauftragekammes mit Markerproteinen zu belegen. Die Auftragung und Auftrennung der Proteine erfolgt automatisch nach einem vorgegebenen Programm bei 15 °C. Nach der SDS-PAGE wird das Gel in die Färbekammer des *Phast Systems* überführt, und die Proteinbanden werden durch eine automatische Silberfärbung sichtbar gemacht.

*Phast*-Puffer: 2,0 M Tris/HCl, pH 8,8  
 50 mM EDTA  
 15 % (m/v) SDS  
 1,5 % (m/v) DTT

Proteingrößenstandard:	<u>Größe [kDa]</u>	<u>Marker-Protein</u>
	97,4	Phosphorylase B
	67,0	Rinderserumalbumin
	45,0	Ovalbumin
	30,0	Carboanhydrase
	20,1	Trypsininhibitor
	14,4	α-Lactalbumin

Die semipräparative Auftrennung von Proteinen für die nachfolgende MALDI-TOF-Analyse bzw. Mikrosequenzierung erfolgt in 4-20 % Tris-Glycin Polyacrylamid-Gradientengele. Im Rahmen der Probenvorbereitung werden zu 12,1 µl Probe 4,7 µl Probepuffer und 1,2 µl *Reducing Agents* gegeben. Die Lösung wird zur Denaturierung der Proteine für 10 min auf 99°C erhitzt und zur Abtrennung unlöslicher Partikel 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nach dem Einbau des Gels in die Elektrophorese-Apparatur wird der Taschenformer des Gels entfernt, und die Probetaschen werden mit Laufpuffer gespült. Zur Auftrennung der Proteine werden die Proben sowie ein Proteingrößenstandard in die Probetaschen des Gels gefüllt und die SDS-PAGE bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Die Elektrophorese dauert ca. 4½ h.

---

<i>Mark12<sup>TM</sup></i> :	<u>Größe [kDa]</u>	<u>Standardprotein</u>
	200,0	Myosin
	116,3	β-Galactosidase
	97,4	Phosphorylase b
	66,3	Rinderserumalbumin
	55,4	Glutamindehydrogenase
	36,5	Lactatdehydrogenase
	31,0	Carboanhydrase
	21,5	Trypsininhibitor
	14,4	Lysozym
	6,0	Aprotinin
	3,5	Insulin B-Kette
	2,5	Insulin A-Kette

<i>SeeBlue<sup>TM</sup></i> :	<u>Größe [kDa]</u>	<u>Standardprotein</u>
	200,0	Myosin
	66,3	Rinderserumalbumin
	55,4	Glutamindehydrogenase
	42,6	Alkohol-Dehydrogenase
	31,0	Carboanhydrase
	17,8	Myoglobin
	14,4	Lysozym
	6,0	Aprotinin
	3,5	Insulin B-Kette

### 6.6.3 Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgt durch verschiedene Färbetechniken, mit denen die Proteine im Gel sichtbar gemacht werden können.

#### 6.6.3.1 Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie-Färbung können ca. 2 µg Protein in einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden [101]. Das Gel wird hierfür ½ h bei RT in der Färbelösung inkubiert. Die

Entfärbung des Hintergrundes erfolgt anschließend durch 2 h Inkubation des Gels in der Entfärbelösung bei RT.

Färbelösung: 0,1 % Coomassie-Blue R 250  
40 % Methanol  
10 % Eisessig  
49,9 % Wasser

Entfärbelösung: 40 % Methanol  
10 % Eisessig  
50 % Wasser

### 6.6.3.2 Silberfärbung

Die Empfindlichkeit der Silberfärbung liegt bei ca. 20 ng pro Proteinbande [102]. Nach der SDS-PAGE werden die Proteine durch 30 min Inkubieren des Gels im Fixierbad (Fixierer) im Gel fixiert. Eine größere Empfindlichkeit der Silberfärbung wird dann durch 30 min Inkubieren des Gels in der *Sensitivlösung* erreicht. Das Gel wird anschließend 3 × 5 min mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, 20 min in Silbernitratlösung inkubiert, 2 × 1 min mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und 2 - 5 min in Entwickler inkubiert. Sobald die Proteine im Gel durch deutliche Färbung hervortreten, wird die Reaktion durch die Zugabe von Stopplösung abgestoppt. Das Gel verbleibt noch 20 min in dieser Lösung. Dann kann es nach 3 × 5 min Waschen mit bidest. H<sub>2</sub>O durch 20 min Inkubieren in 10 %igem Glycerol präpariert werden.

Fixierer: 40 % Ethanol  
10 % Essigsäure

*Sensitivlösung*: 30 % Ethanol  
0,125 % Glutardialdehyd  
0,2 % Natriumthiosulfat  
6,8 % Natriumacetat

Silbernitratlösung: 0,25 % Silbernitrat  
0,015 % Formaldehyd

---

Entwickler:	2,5 %	Natriumcarbonat
	0,01 %	Formaldehyd
Stopplösung:	1,46 %	EDTA

#### 6.6.4 Proteinblotting (Elektroblotting)

Um die nach der SDS-PAGE im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf einer Membran zu immobilisieren, wird die *Semi-dry Blotting*-Technik angewandt [103]. Hierbei werden die Proteine vom SDS-Gel elektrophoretisch in einer Halbtrockenzelle (*Blotkammer*) auf eine Membran übertragen.

Vor dem Blotten wird die Anodenplatte mit H<sub>2</sub>O angefeuchtet und abgewischt. Sechs Lagen Filterpapier (GB002, Schleicher&Schüll) in Gelgröße werden mit Transferpuffer getränkt und auf der Anodenplatte gestapelt. Eine PVDF-Membran [104] gleicher Größe wird in Methanol befeuchtet, in H<sub>2</sub>O getränkt und auf den Filterstapel aufgelegt. Das Gel wird mit der Vorderseite auf die Membran aufgelegt. Weitere drei Lagen Filterpapier in Gelgröße werden mit Transferpuffer getränkt und auf das Gel gelegt, und der komplette Stapel wird luftblasenfrei ausgerollt. Die Kathodenplatte wird mit H<sub>2</sub>O abgewischt, aufgesetzt und mit einem Gewicht (1 kg) beschwert. Der Proteintransfer wird mit einer angelegten Spannung von 1,8 kV bei einer Strombegrenzung von 150 mA (max. 5 mA/cm<sup>2</sup>) und einer Leistungsbegrenzung von 5 W für 30 min durchgeführt.

Transferpuffer:	25 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	150 mM	Glycin
	10 %	Methanol

Gel (zur Kontrolle) und PVDF-Membran werden nach dem Blotten mit Coomassie gefärbt (siehe 6.6.3.1). Das auf der Membran fixierte Protein eignet sich weiterhin zur Immunfärbung, Lektinfärbung, <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Färbung und für die Aminosäure-Sequenzierungen und -analysen [105].

## 6.7 Chromatographische Techniken

### 6.7.1 Gelfiltrations-Chromatographie (GFC)

Zur analytischen GFC wird eine TSK G3000 SW-Säule mit 300 mm Länge und 10 mm Innendurchmesser eingesetzt. Als mobile Phase dienen 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0 bzw. 100 mM Tris/HCl, pH 7,0. In einzelnen Fällen wird der mobilen Phase zur besseren Auftrennung der Probe bis zu 0,5 M NaCl oder 0,5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt. Die Flußgeschwindigkeit der mobilen Phase beträgt je nach Lauf zwischen 0,5 ml/min und 1,0 ml/min. Als Probe werden 100 µl sterilfiltrierte Proteinlösung mit einem Proteingehalt von unter 2,0 mg/ml aufgegeben. Die Chromatographie erfolgt bei RT und wird online überwacht. Hierbei werden die Absorption bei 220 nm und bei 280 nm, der pH-Wert und die Konduktivität der mobilen Phase gemessen und aufgezeichnet.

Die präparative GFC erfolgt an einer TSK G3000 SW-Säule mit 300 mm Länge und 75 mm Innendurchmesser. Hierbei werden die gleichen mobilen Phasen und Proben wie bei der analytischen GFC verwendet, allerdings wird das Probenvolumen auf bis zu 5 ml Proteinlösung erhöht und die Flußgeschwindigkeit bis auf 5 ml/min heraufgesetzt. Es werden 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Überwachung und Aufzeichnung der Chromatographie erfolgt analog zur analytischen GFC.

### 6.7.2 Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Für die Methodenentwicklung wird bei der IEC eine mit Ionenaustauschermedium gepackte 4,6 x 100 mm (1,7 ml) PEEK-Säule eingesetzt. Als mobile Phase dient je nach Art der Chromatographie 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oder 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO. Der pH-Wert des als mobile Phase eingesetzten Puffers wird so gewählt, daß er nicht mehr als 1,2 Einheiten vom pK<sub>i</sub>-Wert des Puffers abweicht. Je nach Lauf beträgt die Flußgeschwindigkeit der mobilen Phase zwischen 1 ml/min und 15 ml/min. Als Probematerial wird für die systematische Methodenentwicklung 0,1 ml des über GFC entsalzenen und über Ultrafiltration aufkonzentrierten xylosyltransferasehaltigen JAR-Zellkulturüberstandes aufgegeben. Nach der Probenauftragung wird die Säule mit 3 CV mobiler Phase gewaschen, und dann werden die am Ionenaustauschermedium elektrostatisch gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten aus 10 CV von 0 M NaCl bis 2 M NaCl eluiert. Im Rahmen der Methodenentwicklung werden der pH-Wert, die Flußgeschwindigkeit und der Gradient des Laufmittels sukzessiv optimiert. Der tatsächliche Verlauf des Gradienten ergibt sich hierbei durch die online-Messung der elektrischen Leitfähigkeit der mobilen Phase. Die

Elution der Proteine wird durch die Messung der Absorption der mobilen Phase bei 220 nm und 280 nm visualisiert und als Diagramm aufgezeichnet. Eine pH-Wert-Kontrolle erfolgt durch ein in die mobile Phase geschaltetes pH-Meter. Es werden 1 ml Fraktionen gesammelt und die XT gemessen.

Um den Vorteil der Perfusions-Chromatographie in Form einer schnellen präparativen Säulenflüssig-Chromatographie von Proteinen auszunutzen, wird ein spezielles Packungsmaterial (POROS) als Grundmatrix verwendet [106]. Die POROS-Teilchen sind auf Styrol-Divinylbenzolbasis aufgebaut und besitzen eine bimodale Porenstruktur. Poren mit einem Porendurchmesser von 600-800 nm (= *Through pores*) bilden die Zugänge zu kleineren Poren (= *Diffusive pores*), die einen Porendurchmesser von 50-100 nm besitzen. Da bei diesem Material die konvektive Strömung nicht nur durch die Kornzwischenräume der Packung der Säule erfolgt, sondern auch durch einen Teil der großen Poren im Innern der Teilchen, ist der Stofftransport gegenüber konventionellem Packungsmaterial mit unimodaler Porenverteilung schneller [107].

Zur Auswahl des für die XT-Reinigung am besten geeigneten Ionenaustauschermediums wird die IEC an den starken Anionenaustauscher POROS 20 HQ (funktionelle Gruppe: quartäres Polyethylenimin) und POROS 20 QE (funktionelle Gruppe: quartäres Polyethylenimin), an dem schwachen Anionenaustauscher POROS 20 PI (funktionelle Gruppe: Polyethylenimin), an den starken Kationenaustauscher POROS 20 HS (funktionelle Gruppe: Sulfopropyl), POROS 20 SP (funktionelle Gruppe: Sulfopropyl) und POROS 20 S (funktionelle Gruppe: Sulfoethyl) sowie an dem schwachen Kationenaustauscher POROS 20 CM (funktionelle Gruppe: Carboxymethyl) systematisch optimiert. Nach der Optimierung erfolgt ein *Scale up*. Solange keine merkliche Verschlechterung der Auftrennung eintritt, wird das auf die Säule gegebene Probenvolumen sukzessiv vergrößert. Anschließend wird bei gleicher Säulenlänge (100 mm) der Säulenquerschnitt (von 4,6 mm auf 16,0 mm) proportional zur aufgegebenen Probemenge vergrößert. Der Eluensfluß, das Dosier- und Fraktionsvolumen werden hierbei entsprechend angepaßt. Die Auftrennung größerer Probenmengen erfolgt durch die Übertragung der Ergebnisse auf ein präparatives zyklisches HPLC-System. Alle chromatographischen Untersuchungen finden bei RT statt.

Nimmt die Auflösung oder die Kapazität der Säule merklich ab, wird eine komplexe Regenerierung des Ionenaustauschermaterials durchgeführt. Dazu werden 10 CV einer Lösung aus 1 M NaCl und 1 M NaOH, dann 10 CV 1 M CH<sub>3</sub>COOH und schließlich 10 CV 30 % MeCN mit 1 % TFA durch die Säule gepumpt.

### 6.7.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

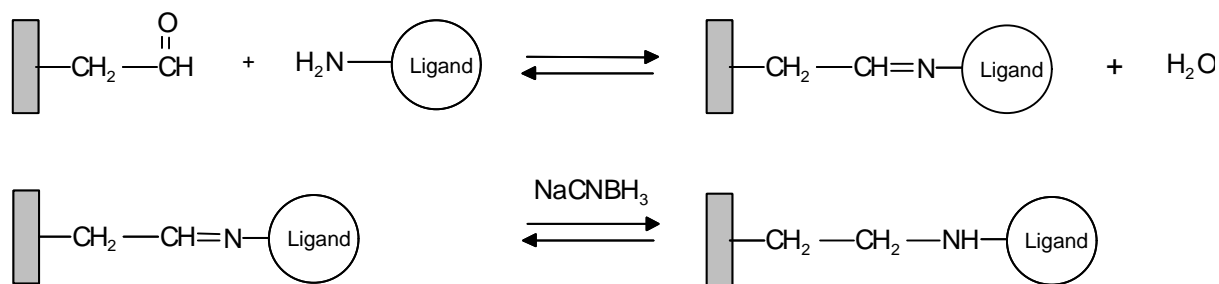
Die drei hydrophoben Interaktionsmedien POROS 20 HP2 (funktionelle Gruppe: Phenyl), POROS 20 PE (funktionelle Gruppe: Phenylether) und POROS 20 ET (funktionelle Gruppe: Ethylether) werden in 4,6 x 100 mm (1,7 ml) PEEK Säulen gepackt und zur systematischen Methodenentwicklung für die Aufreinigung der XT durch HIC eingesetzt. Als mobile Phase dient 20 mM Tris/HCl, pH 7,0, der 3 M NaCl zugesetzt ist. Die Flußgeschwindigkeit des Laufmittels wird je nach Lauf zwischen 1 ml/min und 15 ml/min eingestellt. Als Probe dient durch Ultrafiltration etwa zweifach aufkonzentrierter JAR-Zellkulturüberstand. Analog zum Laufmittel wird die NaCl-Konzentration der Probe vor der Auftragung auf die Säule auf 3 M NaCl eingestellt. Zur Methodenentwicklung werden jeweils 2 ml Probe pro Lauf aufgetragen und Fraktionen von 2 ml gesammelt. Nach Auftragung der Probe wird die Säule zunächst mit 3 CV mobiler Phase gewaschen und dann ein negativer linearer Gradient aus 10 CV von 3 M NaCl bis 0 M NaCl angelegt. Anschließend werden Gradient und Flußgeschwindigkeit der mobilen Phase im Rahmen der Methodenentwicklung optimiert. Während der Chromatographie werden die elektrische Leitfähigkeit, der pH Wert und die Absorption bei 220 nm und 280 nm der mobilen Phase gemessen und registriert. Die Chromatographie erfolgt bei RT. Vor der Messung der XT-Aktivität der gesammelten Fraktionen werden diese einzeln mittels Centricon 3 (NMGT = 3000) 100fach entsalzt.

### 6.7.4 Immobilisierung von Liganden und Affinitätschromatographie

#### 6.7.4.1 Kopplung über Aldehyde

Zur Immobilisierung von Liganden an Aldehyde wird die aktivierte Affinitätsmatrix POROS 20 AL verwendet, da mit dem POROS-Trägermaterial die Vorteile einer späteren Perfusions-Chromatographie nutzbar sind. Die immobilisierten Aldehydgruppen der Matrix reagieren hierbei selektiv mit den primären Amingruppen der zu koppelnden Liganden unter Bildung Schiff'scher Basen, die dann in einer zweiten Reaktion zu sekundären Aminen reduziert werden (Gl. 1). Als Ligand wird das bikuninohomologe Peptid QEEEGSGGGQKK-amid eingesetzt.





Gl. 1 Reaktion eines primären Amids mit einer Aldehydgruppe unter Bildung einer Schiff'schen Base mit anschließender Reduktion der CN-Doppelbindung.

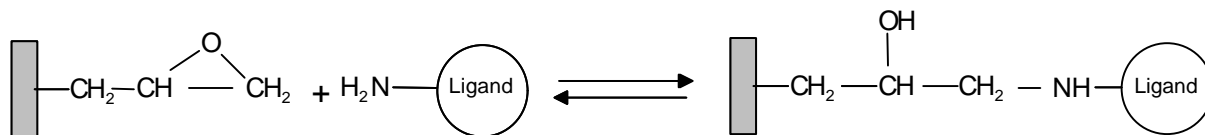
Die Ligandenvorbereitung wird eingeleitet durch das Auflösen von 5,0 mg Peptid in 5,0 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und abgeschlossen durch die Zugabe von 2,5 ml 100 mM PBS, pH 7,4, die 1,5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthalten, sowie durch die Zugabe von 37,5 mg NaCNBH<sub>3</sub>. Zur Kopplung des Peptids werden 200 mg POROS 20 AL Medium zur vorbereiteten Ligandenlösung gegeben und 1 min bei RT leicht geschüttelt. Unter weiterem Schütteln erfolgt die Zugabe von 0,4 ml 100 mM PBS, pH 7,4 mit 1,5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In weiteren fünf Schritten werden dann jeweils 0,91 ml der gleichen salzhaltigen Pufferlösung zugegeben, wobei nach jeder Zugabe jeweils 5 min, aber nach der letzten Zugabe 90 min bei RT leicht geschüttelt wird. Das Medium wird anschließend unter Verwendung eines bindemittelfreien Glasfaserfilters (MN 85/70 BF) abgesaugt, zur Reduktion der bei der Kopplung gebildeten Schiff'schen Basen in 10 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,2 mit 5,0 mg/ml NaCNBH<sub>3</sub> gegeben und dann 30 min bei RT leicht geschüttelt. Danach wird das Medium erneut abgesaugt und zuerst mit 50 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl, dann mit 50 ml 1,0 M NaCl und schließlich mit 100 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl gewaschen. Das Material kann jetzt mit einem Druck von bis zu 170 bar in Säulen gepackt werden.

Rekombinantes Bikunin bzw. die Bikunin-Variante [V<sup>36</sup>,V<sup>38</sup>]<sup>δ1</sup>,[G<sup>92</sup>,I<sup>94</sup>]<sup>δ2</sup> sowie Aprotinin, das Peptid PALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLY, Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat C, Hyaluronsäure, Glykosaminoglykanpolysulfat, Protaminchlorid, *Cibacron Blue 3GA*, *Reactive Green 5*, *Reactive Yellow 2* werden analog an POROS 20 AL immobilisiert.

#### 6.7.4.2 Kopplung über Epoxide

Als Medium für die Kopplung von Liganden an Epoxide wird die aktivierte Affinitätsmatrix POROS 20 EP eingesetzt. Hierbei reagieren Epoxide mit primären Aminen unter Bildung einer sekundären Aminbindung (Gl. 2). Außerdem können Liganden mit Sulfhydryl- oder Hydroxylgruppen an immobilisierte Epoxide kovalent gebunden werden.

Das Peptid TENEGSGLTNIK wird als Ligand eingesetzt. Bei hohem pH Wert (pH 11) ist die Kopplung über die  $\epsilon$ -Aminfunktion (K im Peptid) gegenüber der Kopplung über die  $\alpha$ -Aminfunktion (T im Peptid) begünstigt.



**Gl. 2** Reaktion eines primären Amins mit einem Epoxid. Nach basenkatalysierter Ringöffnung erfolgt die Bildung einer stabilen Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung unter Bildung eines sekundären Amins.

2,5 mg des Peptids werden in 2,5 ml 50 mM PBS, pH 11 gelöst und anschließend wird 400 mg POROS 20 EP Medium zugegeben. Die Immobilisierung des Peptids erfolgt dann durch 6 Tage Rollinkubation bei RT in einem 15 ml Röhrchen. Das Trägermaterial wird danach unter Verwendung eines bindemittelfreien Glasfaserfilters (MN 85/70 BF) abgetrennt und mit 120 ml 50 mM PBS, pH 11 gewaschen. Anschließend wird das Trägermaterial in 4,0 ml wässrigem Mercaptoethanol (5 %, v/v) aufgenommen, und die noch freien Oxirangruppen werden durch Rollinkubation bei RT ÜN blockiert. Das derivatisierte bzw. blockierte Medium wird schließlich mit 80 ml destilliertem Wasser gewaschen und in Säulen gepackt oder in 0,02 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  bei 4°C gelagert.

Das Peptid SENEGSGMAEQK wird analog immobilisiert. In gleicher Weise wird auch UDP an die POROS 20 EP Matrix gekoppelt, nur daß hierbei 90 mg UDP pro Ansatz eingesetzt werden.

### 6.7.4.3 Biotin-Streptavidinkopplung

Für die nichtkovalente Bindung biotinylierter Liganden an eine Streptavidinmatrix wird das Trägermedium POROS 20 BA verwendet. Die Immobilisierung des Liganden erfolgt hierbei an einer mit POROS 20 BA gepackten 2,1 x 30 mm (0,1 ml) ID Kartusche durch die Injektionsmethode. Bei dieser Methode wird in die mobile Phase, die die ID Kartusche durchströmt, der biotinylierte Ligand injiziert. Das hat den Vorteil, daß die Bindungsbildung zwischen biotinyliertem Ligand und Streptavidinmatrix durch die Absorption bei 220 nm bzw. 280 nm der mobilen Phase direkt sichtbar gemacht und quantifiziert werden kann.

Als mobile Phase eignet sich 25 mM PBS, pH 7,0. Im gleichen Puffer wird das biotinylierte Peptid Biot-QEEEGSGGGQKK-amid gelöst, die Konzentration auf 0,1 mg/ml eingestellt und das Absorptionsmaximum bei 220 nm bzw. 280 nm dieser Probe bestimmt. Das Absorptionsmaximum läßt sich durch die Injektion von 100  $\mu\text{l}$  Probe in die mobile Phase bei

überbrückter Kartusche und einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min ermitteln. Zur Immobilisierung des Peptids wird die Kartusche in die mobile Phase geschaltet. Da vor der ersten Injektion noch alle Bindungsstellen der Streptavidinmatrix frei sind, wird nach dieser Injektion das meiste Peptid gebunden. Deshalb ergibt sich hierbei das kleinste Absorptionsmaximum. Bei den anschließenden Injektionen - es werden jeweils 100 µl Probe injiziert - nimmt dann das Absorptionsmaximum sukzessive zu, bis schließlich das Maximum, das sich auch bei überbrückter Kartusche ergab, einstellt. Ist dieser Punkt erreicht, dann ist die Säule abgesättigt, d. h. es wird kein weiteres Peptid an der Streptavidinmatrix gebunden. Die Immobilisierung erfolgt bei RT.

Biotinylierte Proteine werden analog immobilisiert, nur daß hierbei die Konzentration der zu immobilisierenden Proteine auf 1,0 mg/ml eingestellt wird. Beim *Scale up*, d. h. bei der Verwendung größerer Säulen, wird das injizierte Probenvolumen dem Matrixvolumen der Säule entsprechend erhöht.

#### 6.7.4.4 Kopplung über Divinylsulfoxid

Divinylsulfoxid (DVS) dient einerseits als Kopplungsreagenz andererseits als *Spacer* bei der Immobilisierung von UDP bzw. Pyridoxalphosphat (PLP) an POROS 20 OH. Zur Synthese der DVS-aktivierten Matrix werden 2,8 g POROS 20 OH mit 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, in 10 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> suspendiert und dazu 100 µl DVS gegeben. Die Suspension wird mit einem Paddelrührer durchmischt, und nach jeweils zwei Minuten werden weitere 100 µl DVS zugegeben, solange bis insgesamt 1000 µl DVS im Reaktionsansatz enthalten sind. Nach der DVS-Zugabe wird die Suspension noch 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt solange mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr sauer ist. Die DVS-aktivierte Matrix wird in Aceton aufgenommen und bei 4°C gelagert oder weiterverarbeitet.

Zur Kopplung von UDP über DVS werden 400 mg des Nukleotids in 2 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gelöst und dazu 0,5 g DVS-aktivierte Matrix gegeben. Nach 24 h Rollinkubation der Suspension bei RT ist die Reaktion abgeschlossen. Das Reaktionsprodukt wird dann mit ca. 200 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> intensiv gewaschen. Die restlichen noch aktivierten Gruppen der Matrix werden durch die Suspension des Reaktionsprodukts in einer Mischung aus 1,9 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,1 ml 2-Mercaptoethanol blockiert. Die Suspension wird hierfür 2 h bei RT mit einem Paddelrührer durchmischt. Schließlich wird das Reaktionsprodukt intensiv mit ca. 100 ml 1,0 M NaCl gewaschen und kann dann mit bis zu 170 bar Druck in eine Säule gepackt werden. Die Kopplung von PLP über DVS wird analog durchgeführt.

#### 6.7.4.5 Synthese und Kopplung homopolymerer UDP-Ketten

In Anlehnung an eine in der Literatur beschriebenen Methode wird UDP polymerisiert und über eine Phosphatgruppe des Nukleotidpolymers an die Hydroxylgruppe des POROS 20 OH Trägermediums gekoppelt [108].

Zu 3 ml trockenem Pyridin werden 4 mmol (825 mg) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 2 mmol (1018 mg) UDP gegeben. Die Polymerisation des UDP zu homopolymeren Ketten von bis zu zehn Nukleotiden Länge erfolgt durch eine fünftägige Rollinkubation bei RT. Anschließend werden zur Kopplung der UDP-Ketten an eine feste Matrix 840 mg POROS 20 OH und 2 mmol (413 mg) DCC zum Reaktionsprodukt gegeben, und die Mischung wird weitere fünf Tage durch Rollinkubation bei RT durchmischt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsprodukt abgetrennt und mit 400 ml Pyridin gewaschen. Das Reaktionsprodukt wird für 10 h in 200 ml 50 %igem wässrigem Pyridin suspendiert und anschließend zur Entfernung des bei der Reaktion entstandenen Dicyclohexylharnstoffs mit 3 l Methanol gewaschen. Die Entfernung des Methanols erfolgt durch Waschen des Reaktionsprodukts mit 0,5 l H<sub>2</sub>O.

Das Produkt kann jetzt mit einem Druck von bis zu 170 bar in Säulen gepackt werden, oder es wird in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und 0,02 % NaN<sub>3</sub> bei 4°C gelagert.

#### 6.7.4.6 Ligandenchromatographie

Aus der Quantifizierung des immobilisierten Liganden ergibt sich die maximale Bindungskapazität des Affinitätsmediums.

Die mit dem Affinitätsmedium gepackte Säule wird zur Äquilibrierung mit 3 CV mobiler Phase gespült. Als Probe wird über Ultrafiltration aufkonzentrierter und durch GFC entsalzter XT-haltiger JAR-Zellkulturüberstand aufgegeben. Die nichtadsorbierten Bestandteile der Probe werden mit 12 CV mobiler Phase von der Säule gewaschen. Dann erfolgt die Desorption durch Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase. Nach erfolgter Elution des gebundenen Substrats wird die Säule mit der mobilen Phase mit niedriger Ionenstärke äquilibriert.

Als mobile Phase dient 50 mM Natriumacetat, pH 6,0. Durch die Zugabe von 0,6 M NaCl zur mobilen Phase werden die an der Affinitätsmatrix gebundenen Proteine aufgrund der erhöhten Ionenstärke des Laufmittels eluiert. Bei der Chromatographie an dem gruppenspezifischen, makromolekularen Liganden Heparin erfolgt die Elution außerdem durch einen linearen NaCl-Gradienten aus 10 CV von 0 M NaCl bis 2 M NaCl. Dieser Gradient wird im Rahmen einer systematischen Methodenentwicklung optimiert.

Die Flußgeschwindigkeit des Laufmittels beträgt je nach Anwendung zwischen 0,2 ml/min und 10,0 ml/min. Die elektrische Leitfähigkeit, der pH-Wert und die Absorption der mobilen Phase bei 220 nm und 280 nm werden während der Chromatographie gemessen und registriert. Zur Bestimmung der XT-Aktivität der mobilen Phase werden 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Affinitätschromatographie erfolgt bei RT.

#### 6.7.4.7 Chromatographie an monomerem Avidin

Eine mit *ImmunoPure<sup>®</sup> Immobilized Monomeric Avidin* gepackte Säule (5 x 50 mm; 0,982 ml) dient als reversible Affinitätsmatrix für biotinylierte Proteine. Zur Blockierung nicht-reversibler Biotinbindungsstellen wird die Säule mit 3 CV Blockierungspuffer mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,00 ml/min gewaschen. Das locker gebundene Biotin wird anschließend mit 6 CV Regenerierungspuffer von der Matrix gewaschen. Danach wird die Säule mit 8 CV PBS äquilibriert.

Die Auftragung des zu reinigenden biotinylierten Proteins auf die Säule erfolgt mittels *Autosampler* mit einer reduzierten Flußgeschwindigkeit von 0,02 ml/min. Danach wird die Flußgeschwindigkeit des Laufmittels wieder auf 1,00 ml/min heraufgesetzt. Nichtbiotinylierte Proteine werden mit 12 CV PBS von der Säule gewaschen. Die spezifische Elution der gebundenen biotinylierten Moleküle erfolgt durch 3 CV Elutionspuffer. Unspezifisch gebundene Moleküle werden durch 4 CV Regenerierungspuffer eluiert. Schließlich wird die Säule wieder mit 8 CV PBS äquilibriert.

Die Absorption der mobilen Phase bei 280 nm und 327 nm wird während der Chromatographie gemessen und registriert. Zur Bestimmung der XT-Aktivität werden 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Chromatographie erfolgt bei RT.

PBS: 0,10 M  $\text{Na}_3(\text{PO}_4)$ , pH 7,2  
0,15 M NaCl

Blockierungs- bzw. Elutionspuffer: PBS  
2 mM D-Biotin

Regenerierungspuffer: 0,10 M Glycin, pH 2,8

### 6.7.5 Flüssigkeitschromatographie an unpolaren stationären Phasen

Die RP-HPLC wird an einer Pepmap C18-Säule (5 µm; 2,1 x 100 mm; 0,346 ml) durchgeführt. Als mobile Phase dienen Wasser mit 0,1 % TFA und Acetonitril. Zur Analyse werden 20 µl Probe über einen *Autosampler* auf die Säule gegeben. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Probe über einen linearen Wasser + 0,1 % TFA/Acetonitril-Gradienten 0-100 (V/V) bei einer Flußrate von 0,2 ml/min. Der Gradient wird für die jeweilige Auftrennung optimiert. Hierbei wird die Absorption der mobilen Phase bei 220 nm, 280 nm, und 327 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt bei einer Extinktionswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Es werden 2 ml Fraktionen zur Bestimmung der XT-Aktivität des Eluats gesammelt. Die Chromatographie wird unter Helium bei RT durchgeführt.

## 6.8 Immunologische Techniken

### 6.8.1 Polyklonale Antikörper

Als Basis für die Herstellung von polyklonalen Anti-XT-Antikörper dienen einerseits die nach enzymatischer Spaltung des 120 kDa Protein erhaltenen Aminosäuresequenzen, andererseits die auf der Grundlage dieser Sequenzen ermittelten DNA-Fragmente bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen [79]. Die synthetischen Peptide CSRQKELLKRKLEQQEK und CQFSEVGTDWDAKER wurden synthetisiert, durch RP-HPLC gereinigt und zur Immunisierung in Kaninchen eingesetzt. Die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma BioScience (Göttingen, Germany) durchgeführt.

### 6.8.2 *Dot-blot*-ELISA

Zur Kontrolle der Immunisierung eignet sich der *DOT-blot*-ELISA als schneller Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei werden 0,5 µl Antigen (bzw. Kontrollen) in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2 auf 1 x 10 cm methanolbehandelte PVDF-Membran aufgetropft und getrocknet. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt durch eine Immunfärbung (siehe 6.8.4).

### 6.8.3 Western-Blot

Die nach einer SDS-PAGE (siehe 6.6.2) aufgetrennten Proteine werden über Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran (Immobilon P) übertragen (siehe 6.6.4) und dadurch für die nachfolgende Immundetektion (siehe 6.8.4) immobilisiert.

### 6.8.4 Immundetektion

Die freien Bindungsstellen der Membran werden mit 2 %igem BSA in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2 für eine Stunde blockiert. Die Membran wird dreimal mit PBST gewaschen, 2 ml Antikörperenthaltende Probe in PBST werden hinzugefügt und 1–3 h inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wird die Membran dreimal mit PBST gewaschen. 1 ml Peroxidase markierte Sekundärantikörper werden zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wird dreimal mit PBST und einmal mit Zitrat-Phosphatpuffer gewaschen und zur Farbentwicklung werden 2 ml Substratlösung hinzugefügt. Die Detektion sollte bei längerer Dauer im Dunkeln erfolgen. Um die Reaktion zu stoppen wird die Membran mit Wasser gewaschen.

PBST:                                    0,05 M PBS, pH 7,4  
    0,15 M NaCl  
    0,05 % Tween 20

Zitrat-Phosphatpuffer:            0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5,0  
    0,1 M Zitronensäure

Substratlösung:                        5,0 ml Zitrat-Phosphatpuffer  
    1,0 ml 4-Chloro-1-naphtollösung (3 mg/ml in Methanol)  
    2,4 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 6.8.5 Immobilisierung des Antigens

Das Antigen CSRQKELLKRKLEQQEK wird an das Trägermedium POROS 20 EP gekoppelt. Dazu werden 1,6 ml des Peptids in 1,2 ml einer Lösung aus 10 mM PBS, pH 7,4 und 150 mM NaCl gelöst und 0,60 ml 100 mM PBS, pH 7,4 mit 1,50 M NaCl zugegeben. In der Lösung werden 400 mg POROS 20 EP suspendiert, und die Suspension wird bei RT

geschüttelt. Nach jeweils 10 min, fünfmal insgesamt, werden weitere 0,24 ml 100 mM PBS, pH 7,4 mit 1,50 M NaCl zur Suspension gegeben. Die Suspension wird 5 Tage bei RT geschüttelt und dann mit einem gesinterten Glasfilter filtriert. Die Matrix wird in 4 ml 0,2 M PBS, pH 7,4 mit 0,1 M 2-Mercaptoethanol suspendiert und 2 h bei RT gemischt. Das Medium wird in einem gesinterten Glasfilter mit 20 ml 10 mM PBS, pH 7,4, die 150 mM NaCl enthält, gewaschen. Nach weiteren Waschschritten mit 20 ml 1,0 M NaCl und 20 ml 10 mM PBS, pH 7,4 wird die Matrix in eine (4,6 x 50 mm) PEEK Säule gepackt.

### **6.8.6 Antikörperreinigung**

Das Antiserum wird auf 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 eingestellt. Diese Lösung wird mit einem 0,2 µm Filter filtriert, und 0,4 ml des Filtrats werden bei einer Flußgeschwindigkeit von 10 ml/min auf eine Antigensäule aufgegeben, die zuvor mit 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 (mobile Phase) äquilibriert wurde. Die nicht an die Säule bindenden Moleküle des Antiserums werden mit 4,1 ml mobiler Phase und die unspezifisch gebundenen Moleküle mit 12,5 ml mobiler Phase unter Zusatz von 0,15 M NaCl von der Säule gespült. Adsorbierte Antikörper werden durch 12,4 ml 50 mM Natriumcitrat, pH 3,0 mit 0,15 M NaCl eluiert, und die Säule wird dann mit 3,4 ml 100 mM Natriumcitrat, pH 3,0 mit 1,50 M NaCl regeneriert. Das Eluat wird in 10 ml Fraktionen in einseitig verschlossenen Vorratsröhrchen gesammelt, die 2 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 8.0 enthalten, um die Zitronensäure unmittelbar nach der Chromatographie zu neutralisieren.

### **6.8.7 Herstellung einer Immunaффinitätssäule**

Gereinigte Antikörper werden durch Ultrafiltration an einer YM1-Cellulosemembran auf eine Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml aufkonzentriert. Die Antikörperlösung wird auf 10 mM PBS, pH 7,4 und 0,15 M NaCl eingestellt. Nach der Filtration der Lösung mit einem 0,2 µm Filter werden 100 µl Filtrat bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min auf eine (2,1 x 30 mm) POROS 20 PA Säule gegeben. Dieser Schritt wird 17mal wiederholt.

Um die Antikörper kovalent an die Säule zu binden, werden die adsorbierten Antikörper mit der Säulenmatrix durch Triethanolamin vernetzt. Die Säule wird dazu nach dem Waschen mit 5 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und mit 2 ml 100 mM Triethanolamin bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gespült. Diese Prozedur wird unter Verwendung von insgesamt 14 ml Triethanolamin sechsmal wiederholt. Zum Blockieren der noch



verbleibenden reaktiven funktionellen Gruppen des Triethanolamins werden 2 ml 100 mM Monoethanolamin, pH 9,0 mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 2 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl wird der Blockierungsschritt mit weiteren 2 ml 100 mM Monoethanolamin, pH 9,0 wiederholt. Zur Reinigung wird die Säule dreimal abwechselnd mit 2 ml 10 mM PBS, pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und mit 2 ml 12 mM HCl gewaschen.

### 6.8.8 Immunaффinitätschromatographie

Die nach Heparin-Aффinitätschromatographie partiell aufgereinigte XT wird an einer YM1-Membran entsalzen und zur Abtrennung fester Partikel durch einen 0,2 µm Filter gepreßt. 100 µl dieser XT-Probe werden bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die zuvor mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquibrierte Immunaффinitätssäule gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch 1,4 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 und durch 8,5 ml des gleichen Puffers mit 150 mM NaCl von der Säule gewaschen. Die XT-Elution erfolgt durch 4,2 ml 12 mM HCl, gefolgt durch 1,2 ml 12 mM HCl mit 1,5 M NaCl. Alternativ wird die Elution mit 100 µl des in 20 mM Tris/HCl gelösten Antigens (1 mg/ml) durchgeführt. Nach dem Waschen der Säule durch 8,5 ml 20 mM Tris/HCl mit 45 mM NaCl erfolgt eine zweite Elution durch 8,5 ml 12 mM HCl mit 45 mM NaCl. Durch 1,2 ml 12 mM HCl mit 1,5 M NaCl wird die Säule regeneriert. Fraktionen von 1 ml werden in einseitig verschlossenen Röhrchen gesammelt, die zur unmittelbaren Neutralisation der HCl 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 enthalten. Die XT-Aktivität der Fraktionen wird bestimmt.

## 6.9 Dreikomponentenvernetzung

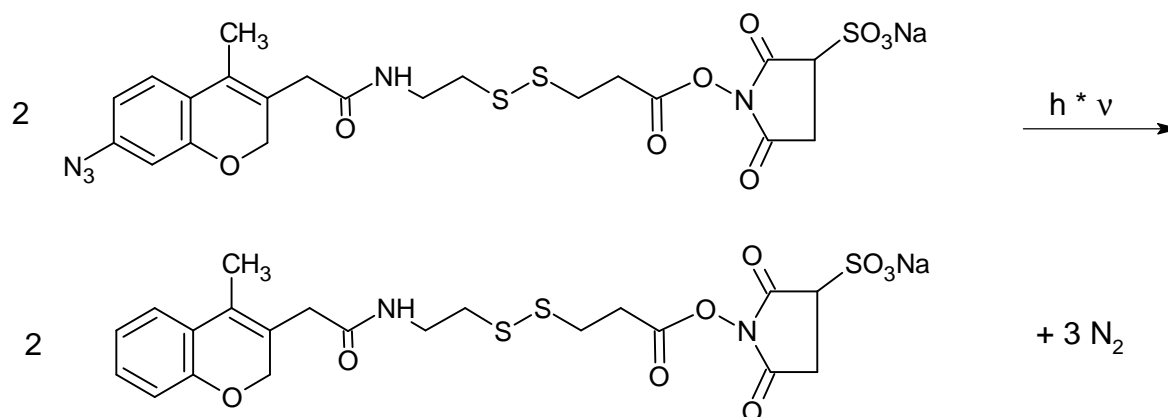
Bei der Dreikomponentenvernetzung reagieren die drei Komponenten Bindungsprotein, Ligand und Vernetzer miteinander. Diese Reaktion kann zur selektiven und kovalenten Markierung des Bindungsproteins in komplexen Proteingemischen ausgenutzt werden.

Zu einer Markierung der Xylosyltransferase wird der heterobifunktionelle, aminreaktive, wasserlösliche, spaltbare, photoreaktive Vernetzer Sulfosuccinimidyl-2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-acetamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAED) eingesetzt. Der Extinktionskoeffizient für das UV-Absorptionsmaximum des Moleküls bei einer Wellenlänge von 327 nm beträgt für eine 1 mg/ml Lösung in Acetonitril:Wasser (15:2)  $18200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Nach photoinduzierter Vernetzung des Moleküls mit einem Polypeptid ermöglicht die 7-Amino-4-

methylcoumarinfunktion (AMCA) des SAED-Derivats zudem eine Fluoreszenzdetektion bei einer Extinktionswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 - 460 nm. Als Ligand bei der Vernetzung wird das biotinylierte Xylosyltransferase-Substrat Biot-QEEEGSGGGQKK-amid eingesetzt, da es sich vor bzw. nach der Vernetzung selektiv über monomeres Avidin aus dem Proteingemisch abtrennen läßt.

### 6.9.1 Photoinduzierte Aktivierung der Azidgruppe von SAED

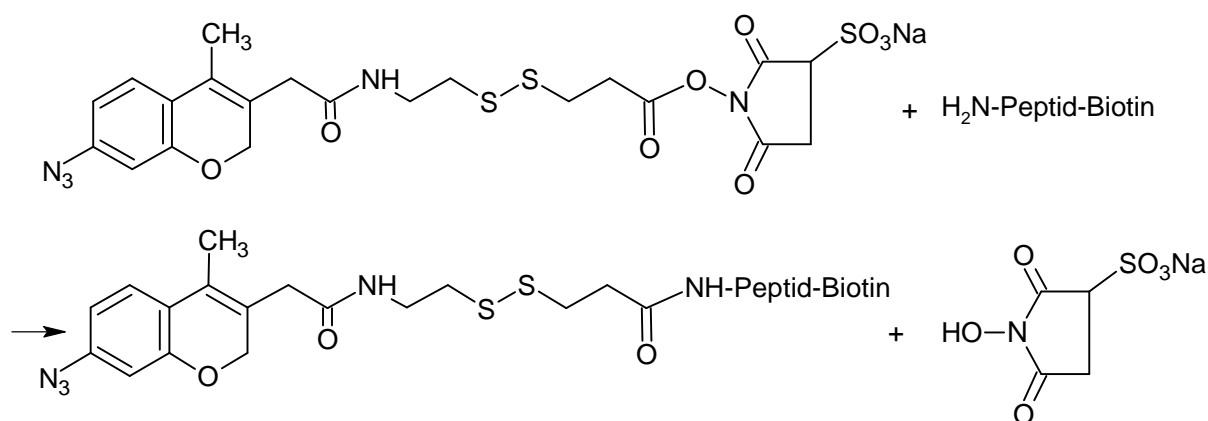
Um die optimale Bestrahlungsdauer für die spätere photoinduzierte Vernetzung des SAED mit dem Liganden zu bestimmen, wird zunächst die Fluoreszenzzunahme der AMAC-Funktion des Vernetzers durch UV-Bestrahlung untersucht. Dazu werden 0,4 mg SAED in 1 ml DMSO gelöst und mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bei RT bestrahlt (Gl. 3). Von der unbestrahlten Probe sowie von der bestrahlten Probe wird jeweils nach 15 s Bestrahlung 1 µl der Lösung entnommen, mit 99 µl DMSO verdünnt und dann die Fluoreszenz bei einer Extinktionswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm bestimmt. Hierbei wird die Probe auf eine Pepmap C18-Säule (5 µm; 2,1 x 100 mm; 0,346 ml) gegeben, mit Acetonitril:Wasser (15:2) eluiert und die Fluoreszenz des Eluats detektiert und registriert. Die Flußrate beträgt 0,2 ml/min. Diese Arbeitsschritte werden so oft wiederholt, bis keine Fluoreszenzzunahme mehr feststellbar ist.



Gl. 3 Erzeugung der fluoreszierenden AMAC-Funktion durch photoinduzierte Abspaltung der Azidgruppe des SAED-Moleküls.

### 6.9.2 Synthese des SAED-Xylosyltransferase-Substrats

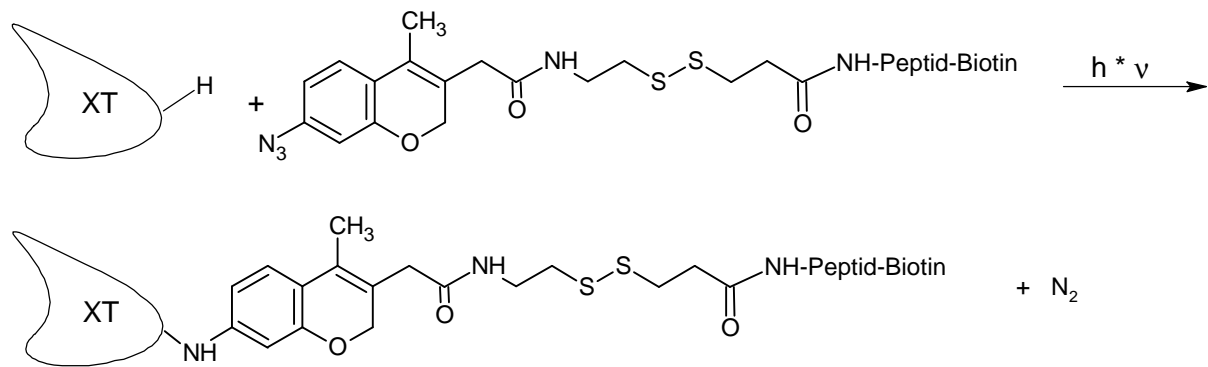
Bei der Umsetzung des Biot-QEEEGSGGGQKK-amids (Biot-QEEE-NH<sub>2</sub>) mit SAED wird der Vernetzer, wegen der konkurrierenden Hydrolysereaktion im wässrigen Medium, in 10fachem molarem Überschuss eingesetzt. Für die Synthese des SAED-Xylosyltransferase-Substrats werden 0,2 mg des Peptids in 40 µl 0,1 M HEPES, pH 8,0 gelöst, und zu 0,8 mg SAED werden im Dunkeln 16 µl DMSO gegeben. Die Reaktion erfolgt anschließend durch Zusammenpipettieren der beiden Lösungen im Dunkeln bei RT (Gl. 4). Nach ca. 1 h ist die Reaktion abgeschlossen. Das Syntheseprodukt wird in der RP-HPLC analysiert und dient zur photoinduzierten Vernetzung.



**Gl. 4** Nukleophile Esterspaltung durch ein primäres Amin unter Freisetzung der NHS-Abgangsgruppe und der Ausbildung einer stabilen Amidbindung.

### 6.9.3 Photoinduzierte Vernetzung

Zu 50 µl 100fach aufkonzentriertem JAR-Zellkulturüberstand werden 50 µl ungereinigtes SAED-Xylosyltransferase-Substrat gegeben. Das Gemisch wird 90 s mit UV-Licht der Wellenlänge 315 nm bei RT bestrahlt (Gl. 5). Anschließend erfolgt die Abtrennung von ausgefallenem Protein durch Zentrifugation (5 min, 13000 g). Der Überstand wird abgehoben, auf Xylosyltransferaseaktivität geprüft und in der Affinitätschromatographie an monomerem Avidin eingesetzt.



**Gl. 5** Photoinduzierte Abspaltung des Stickstoffs einer Azidgruppe unter Bildung eines sehr kurzlebigen, hochreaktiven Nitrens (nicht dargestellt) als Zwischenprodukt und anschließende Insertion des Nitrens in eine CH-Bindung unter Bildung einer stabilen Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung.

## 6.10 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die gereinigte XT wird mit Trypsin oder mit der Endoproteinase Lys-C über Nacht bei 37°C verdaut und anschließend durch MALDI-MS analysiert [109]. Die Zentrale Proteinanalytik R0800 des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg führte die MALDI-Analyse durch.

## 6.11 Aminosäuresequenzanalyse der XT

Die durch die proteolytische Spaltung der XT durch Trypsin bzw. durch Endoproteinase Lys-C generierten Peptide werden durch RP-HPLC aufgetrennt und anschließend durch Edman-Abbau sequenziert. Die Zentrale Proteinanalytik R0800 des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg führte die Aminosäuresequenzanalyse durch.

## 7. Material und Geräte

### 7.1 Zelllinien

A-431 (human, Epidermiskarzinom)	DSMZ, Braunschweig
BM-1604 (human, Prostatakarzinom)	DSMZ, Braunschweig
JAR (human, Plazentachoriokarzinom)	ATCC, Rockville, USA
MHH-ES-1 (human, Knochensarkom)	DSMZ, Braunschweig
RPMI 2650 (human, Nasalseptumkarzinom)	ATCC, Rockville, USA
SAOS-2 (human, Knochensarkom)	DSMZ, Braunschweig
SW 982 (human, Synovialsarkom)	ATCC, Rockville, USA
SW 1353 (human, Chondrosarkom)	ATCC, Rockville, USA
WERI-RB-1 (human, Netzhautblastoma)	DSMZ, Braunschweig
Y-79 (human, Retinoblastom)	DSMZ, Braunschweig

### 7.2 Bakterienstämme

<u>BL21 (DE3)</u>	Novagen, Madison, USA
-------------------	-----------------------

Dieser Stamm eignet sich in Verbindung mit Expressionsvektoren, deren Expressionsregion unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Operators steht (z. B. pET-Vektoren), sehr gut zu deren Expression.

Im Genom dieses Stammes ist ein lysogener  $\lambda$ DE3-Bakteriophage mit einem T7-RNA-Polymerase-Gen unter Lac UV5 / Lac I-Promotor-Kontrolle integriert. Da die Insertion im Int-Gen liegt, kann der  $\lambda$ -Phage nicht mobilisiert werden. Unter Einfluß von IPTG wird die Promotor/Operator-Kombination induziert und das T7-RNA-Polymerase-Gen transkribiert. Bei einem Vektor mit T7-Promotor kommt es dadurch zur intensiven Expression. Da dieser Stamm weder Ion- noch Omp T-Proteinase produziert, ist die Degradation rekombinanter Fremdproteine stark vermindert.

### 7.3 Reagenzien-Sätze

Bicinchoninsäure-Proteinbestimmungs-Kit (Quantitative Gesamtproteinbestimmung)	Sigma, Deisenhofen
<i>ImmunoPure<sup>â</sup> Immobilized Monomeric Avidin</i>	Pierce, IL, USA

Phast System: Polyacrylamid-Fertiggele,  
Pufferstreifen  
(Automatisierte Gelelektrophorese)

Pharmacia, Freiburg

## 7.4 Reagenzien

Ampholyte für IEF

Biorad, München

Antikörper, -HRP

Dianova, Hamburg

Antikörper, Kaninchen, polyklonal

Bioscience, Göttingen

Aprotinin

Bayer, Leverkusen

Endoproteinase Lys-C

Roche, Mannheim

IPTG

Eurogentic, Seraing, Belgien

Laufpuffer für SDS-PAGE

NOVEX, CA, USA

LMW-Proteinstandard

Pharmacia, Freiburg

N-Glykosidase F

Roche, Mannheim

Peptide: Biot-QEEEGSGGGQKK-amid

QCB, Hopkinton, MA, USA

SENEGSGMAEQK

QCB, Hopkinton, MA, USA

TENEGSGLTNIK

QCB, Hopkinton, MA, USA

CSRQKELLKRKLEQKEK

BioScience, Göttingen

CQFSEVGTDWDAKER

BioScience, Göttingen

PALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLY

Bachem, Heidelberg

Probepuffer für SDS-PAGE

NOVEX, CA, USA

Proteinstandard: *Mark12<sup>tm</sup>*

NOVEX, CA, USA

Proteinstandard: *SeeBlue<sup>tm</sup>*

NOVEX, CA, USA

*Reducing Agents* für SDS-PAGE

NOVEX, CA, USA

UDP-[<sup>14</sup>C]Xylose

DuPont NEN, Bad Homburg

UltraDOMA-PF Zellkulturmedium

BioWhittaker, Vervier, Belgien

SAED (photoreaktiver Vernetzer)

Pierce,

Szintillationsflüssigkeit

Beckman Coulter, München

Trägermaterialien (HPLC):POROS 20 HQ

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 QE

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 PI

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 HS

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 SP

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 S

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 CM

Perseptive Biosystems, MA, USA

POROS 20 HP2	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 PE	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 ET	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 AL	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 EP	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 BA	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 OH	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 PA	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 MC	Perseptive Biosystems, MA, USA
POROS 20 HE	Perseptive Biosystems, MA, USA
Tris-Glycin Polyacrylamid-Gradientengele (4-20 %)	NOVEX, CA, USA
Trypsin	Roche, Mannheim

Alle weiteren verwendeten Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt, oder Sigma, Deisenhofen, bezogen.

## 7.5 Geräte

ACA Analyzer	Dade Behring Diagnostica, München
Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Bioreaktor TECNOMOUSE	Integra Biosciences, Fernwald
<i>Blot</i> -Apparatur für Proteine	Biometra, Göttingen
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
Chromatographieschrank, gekühlt	UniEquip Laborgerätebau, Martinsried
C18-Säule Pepmap	Perseptive Biosystems, MA, USA
Datenverarbeitung	IBM kompatibler Pentium II PC mit Windows-Software
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern	NOVEX, CA, USA
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg
ELISA-Reader Dynatech MR 5000	Dynatech, Guernsey, Channel Islands
FPLC-Anlage und -Säulen	Pharmacia, Freiburg

Fraktionssammler Gilson FC 205	Gilson, WI, USA
Gelfiltrationssäule TSK G3000 SW	TosoHaas, PA, USA
HPLC-Anlage Sprint	Perseptive Biosystems, MA, USA
HPLC-Anlage Integral	Perseptive Biosystems, MA, USA
Inkubator Biometra APT-Line	Biometra, Göttingen
Lyophilisator Alpha 1-4	Christ, Osterode
Magnetrührer	Renner GmbH, Darmstadt
Massenspektrometer Reflex II	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
pH-Meter Calimatic 761	Knick, Berlin
Photometer Biochrom Ultraspec 4050	Pharmacia, Freiburg
Proteinsequencer Procise 494 cLC	PE Biosystems, MA, USA
Rollersystem	Integra Biosciences, Fernwald
Rotofor-System	Biorad, München
Rührzellen	Millipore, Eschborn
Schüttler Celloshaker Variospeed	Renner, Darmstadt
Spannungsgerät <i>Power Supply</i> PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein
Spiralzelle	Sartorius, Göttingen
Sterilbank Airone LF-640	Safelab-Systems, Bistol, England
Sterilbank Variolab W 90 (Klasse II)	Waldner Laboreinrichtung, Wangen
Super G Analyzer	RLT, Möhnesee
Szintillationscounter LS5000TD	Beckman Coulter, CA, USA
Temperaturbad	Julabo, Seelbach
Thermometer	Barkey Labortechnik, Bielefeld
Vakuumkonzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Vakuumzentrifuge	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender und Hobei, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau

## 7.6 Sonstiges Material

Cytodex 3	Pharmacia, Freiburg
Dialyseschlauch	Sigma, Deisenhofen



---

Filterpapier GB002	Schleicher & Schüll
Mikrokonzentratoren und Zubehör	Amicon, Witten
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrozellulosemembran	Sartorius, Göttingen
PVDF-Membran (Immobilon P)	Millipore, Eschborn
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
Rollerflaschen (Costar)	Becton Dickinson, Heidelberg
Rollerflaschen (Falcon)	Integra Biosciences, Fernwald
Serologische Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Ultrafiltrationsmembranen	Amicon, Witten
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg

## 8. Abkürzungen

### Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

### Weitere Abkürzungen:

AMAC	7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetyl
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumine</i> )
CHAPS	3-[ <i>N</i> -(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CDP	Cytidindiphosphat
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline</i> )
CV	Säulenvolumen ( <i>Column volume</i> )

---

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DVS	Divinylsulfon
EC	Extrikapillarraum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>Foetal calf serum</i> )
<i>g</i>	Erdbeschleunigung bzw. Gravitation (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAG	Glykosaminoglykan(e)
Gal	Galactose
GAGPS	Glykosaminoglykanpolysulfat
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GlcA	Glucuronsäure
h	Stunde(n) (Hour)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie ( <i>Hydrophobic interaction chromatography</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
IC	Interkapillarraum
IEC	Ionenaustauschchromatographie ( <i>Ion exchange chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranisid
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation
MES	2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NMGT	Nominelle Molekulargewichts-Trenngrenze
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,05 % Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PG	Proteoglykan(e)
PLP	Pyridoxalphosphat
PVDF	Polyvinylfluorid
PTFE	Polytetrafluorethylen

---

RER	Endoplasmatisches Retikulum
RPC	<i>Reversed-Phase</i> -Chromatographie
RP-HPLC	<i>Reversed-Phase</i> -Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>Reversed phase high performance liquid chromatography</i> )
RT	Raumtemperatur
SAED	Sulfosuccinimidyl 2-(7-azido-4-methyl-coumarin-3-acetamido)-ethyl- 1,3'-dithiopropionat
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
ÜN	Über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
ZKF	Zellkulturflasche
ZKÜ	Zellkulturüberstand

**9. Literatur**

- [1] Stryer, L., Biochemie, 4. Auflage. Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum Akad. Verlag (1991).
- [2] Lindahl, U., and Höök, M.: Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 385-417 (1978).
- [3] Lamberg, S.J., and Stoolmiller, A.C.: Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review. *J. Invest. Dermatol.* **63**, 433-449 (1974).
- [4] Greiling, H., Gressner, A.M., Haubeck, H.-D., Keller, R., und Kleesiek, K.: Bindegewebe. In: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Greiling, H., Gressner, A.M., Hrsg. Schattauer, Stuttgart, New York: 1090-1131 (1995).
- [5] Kjéllen, L., and Lindahl, U.: Proteoglycans: structures and interaction. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475 (1991).
- [6] Kuettner, K.E., and Kimura, J.H.: Proteoglycans: An Overview. *J. Cell. Biochem.* **27**, 327-336 (1985).
- [7] Hardingham, T.: Proteoglycans: their structure, interactions and molecular organisation in cartilage. *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 489-497 (1981).
- [8] Perrimon, N., and Bernfield, M.: Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**, 725-728 (2000).
- [9] Nathan, A., Nugent, M.A., and Edelman, E.R.: Tissue engineered perivascular endothelial cell implants regulate vascular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8130-8134 (1995).
- [10] Yost, H.J.: Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature* **357**, 158-161 (1992).
- [11] Sanderson, R.D., Turnbull, J.E., Gallagher, J.T., and Lander, A.D.: Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behavior. *J. Biol. Chem.* **269**, 13100-13106 (1994).
- [12] Hardingham, T.E., and Fosgang, A.J.: Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870 (1992).

- 
- [13] Fisher, L.W., Termine, J.D., and Young, M.F.: Deduced-protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J. Biol. Chem.* **264**, 4571-4576 (1989).
- [14] Fukushima, D., Butzow, R., Hildebrand, A., and Ruoslahti, E.: Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **268**, 22710-22715 (1993).
- [15] Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., and Ruoslahti, E.: Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem. J.* **302**, 527-534 (1994).
- [16] Kaname, S., and Ruoslahti, E.: Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor-beta. *Biochem. J.* **315**, 815-820 (1996).
- [17] Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W.: Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411-414 (2000).
- [18] Hardingham, T.E.: Structure and Biosynthesis of Proteoglycans. In: *Connective Tissue: Biological and Clinical Aspects*. Kühn, K., Krieg, T., Hrsg. Basel: Krager 143-83 (1986).
- [19] Hagopian, A., and Eylar, E.A.: Glycoprotein biosynthesis: studies on the receptor specificity of the polypeptidyl: N-acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands. *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 422-433 (1968).
- [20] Sadler, J.E., *Biology of Carbohydrates*. Ginsburg, V., and Robbins, P.W., eds, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons, 87-131 (1984).
- [21] Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C., and Hill, R.L.: Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **52**, 23-175 (1981).
- [22] Wickner, W.T., and Lodish, H.F.: Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* **230**, 400-407 (1985).
- [23] Paulson, J.C., Weinstein, J., Ujita, E.L., Riggs, K.J., and Lai, P.H.: The membrane-binding domain of a rat liver Golgi sialyltransferase. *Biochem. Soc. Trans.* **15**, 618-620 (1987).

- 
- [24] Breton, C., Bettler, E., Joziase, D.H., Geremia, R.A., and Imperty, A.: JB review: sequence-function relationship of prokaryotic and eukaryotic Galactosyltransferases. *J. Biochem.* **123**, 1000-1009 (1998).
- [25] Paulson, J.C., and Colley, K.J.: Minireview: Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618 (1989).
- [26] Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., and Hanover, J.A.: O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272**, 9316-9324 (1997).
- [27] Varki, A.: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
- [28] Colley, K.J.: Minireview: golgi localization of glycosyltransferases: more question than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13 (1997).
- [29] Nakaishi, H., Sanai, Y., Shiroki, K., and Nagai, Y.: Analysis of cellular expression of gangliosides by gene transfection. I: GD3 expression in myc-transfected and transformed 3Y1 correlates with anchorage-independent growth activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 760-765 (1988).
- [30] Nakaishi, H., Sanai, Y., Shibuya, M., and Nagai, Y.: Analysis of cellular expression of gangliosides by gene transfection. II: Rat 3Y1 cells transformed with several DNAs containing oncogenes (fes, fps, ras & src) invariably express sialosylparagloboside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 766-774 (1988).
- [31] Matsuura, H., Greene, T., and Hakomori, S.: An alpha-N-acetylgalactosaminyl-ation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin. *J. Biol. Chem.* **264**, 10472-10476 (1989).
- [32] Shoreibah, M.G., Hindsgaul, O., and Pierce, M.: Purification and characterization of rat kidney UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2920-2927 (1992).
- [33] Trayer, I.P., and Hill, R.L.: The purification and properties of the A protein of lactose synthetase. *J. Biol. Chem.* **246**, 6666-6675 (1971).
- [34] Andrews, P.: Purification of lactose synthetase. A protein from human milk and demonstration of its interaction with alpha-lactalbumin. *FEBS Lett.* **9**, 297-300 (1970).

- [35] Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K., and Taniguchi, N.: Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine:β-D-mannoside β-1,4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney. *J. Biol. Chem.* **267**, 18199-18204 (1992).
- [36] White, T., Bennett, E.P., Takio, K., Sorensen, T., Bonding, N., and Clausen, H.: Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-α-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24156-24165 (1995).
- [37] Sorensen, T., White, T., Wandall, H.H., Kristensen, A.K., Roepstorff, P., Clausen, H.: UDP-N-acetyl-α-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24166-24173 (1995).
- [38] Paul, P., Kamisaka, Y., Marks, D.L., and Pagano, R.E.: Purification and Characterization of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 2287-2293 (1996).
- [39] Schulte, S., and Stoffel, W.: Ceramide UDP-galactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10265-10269 (1993).
- [40] Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., and Matsuo, N.: Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide β-1,4- galactosyltransferase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 13570-13577 (1998).
- [41] Fujita-Yamaguchi, Y., and Yoshida, A.: Purification and characterization of human serum galactosyltransferase (lactose synthetase A protein). *J. Biol. Chem.* **256**, 2701-2706 (1981).
- [42] Sarnesto, A., Kohlin, T., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M.: Purification of H gene-encoded beta-galactoside alpha-1,2-fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* **265**, 15067-15075 (1990).
- [43] Sarnesto, A., Kohlin, T., Hindsgaul, O., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M.: Purification of the secretor-type beta-galactoside alpha-1,2-fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* **267**, 2737-2744 (1992).
- [44] Sarnesto, A., Kohlin, T., Hindsgaul, O., Vogele, K., Blaszczyk-Thurin, M., and Thurin, J.: Purification of the beta-N-acetylglucosaminide alpha-1,3-fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* **267**, 2745-2752 (1992).
- [45] Schwartz, N.B.: Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of β-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *J. Biol. Chem.* **252**, 6316-6321 (1977).



- 
- [46] Kearns, A.E., Vertel, B.M., Schwartz, N.B.: Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *J. Biol. Chem.* **268**, 11097-11104 (1993).
- [47] Vertel, B.M., Walters, L.M., Flay, N., Kearns, A.E., Schwartz, N.B.: Xylosylation is an endoplasmatic reticulum to golgi event. *J. Biol. Chem.* **268**, 11105-11112 (1993).
- [48] Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., Schwartz, N.B.: Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: A kinetic analysis of UDP-D-xylose: core-protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase. *Biochemistry* **30**, 7477-7483 (1991).
- [49] Schwartz, N.B.: Chondroitin sulfate glycosyltransferases in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **251**, 3346-3351 (1976).
- [50] Cambell S.C., Schwartz, N.B.: Kinetics of intracellular processing of chondroitin sulfate proteoglycan core protein and other matrix components. *J. Cell Biol.* **106**, 2191-2202 (1988).
- [51] Baker, J.R., Rodén, L., and Stoolmiller, A.C.: Biosynthesis of chondroitin sulfate proteoglycan. Xylosyl transfer to Smith-degraded cartilage proteoglycan and other exogenous acceptors. *J. Biol. Chem.* **247**, 3838-3847 (1972).
- [52] Rodén, L., Smith, R.: Structure of the neutral trisaccharide of the chondroitin-4-sulfate-protein linkage region. *J. Biol. Chem.* **241**, 5949-5954 (1966).
- [53] Pearson, C.H., Winterbottom, N., Fackre, D.S., Scott, P.G., Carpenter, M.R.: The NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of bovine skin proteodermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* **258**, 15101-15104 (1983).
- [54] Bourdon, M.A., Oldberg, Å, Pierschbacher, M., and Ruoslahti, E.: Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1321-1325 (1985).
- [55] Oldberg, Å, Hayman, E.G., and Ruoslahti, E.: Isolation of a chondroitin sulfate proteoglycan from a rat yolk sac tumor and immunochemical demonstration of its cell surface localization. *J. Biol. Chem.* **256**, 10847-10852 (1981).
- [56] Chopra, R.K., Pearson, C.H., Pringle, G.A., Fackre, D.S., and Scott, P.G.: Dermatan sulfate is located on serine-4 of bovine skin proteodermatan sulphate. Demonstration that most molecules posses only one glycosaminoglycan chain and comparison of amino acid sequences around glycosylation sites in different proteoglycans. *Biochem. J.* **232**, 277-279 (1985).

- [57] Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., and Schwartz, N.B.: Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3194-3198 (1987).
- [58] Stoolmiller, A.C., Horwitz, A.L., and Dorfman, A.: Biosynthesis of the chondroitin sulfate proteoglycan. Purification and properties of xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3525-3532 (1972).
- [59] Sandy, J.D.: The assay of xylosyltransferase in cartilage extract. A modified procedure for preparation of Smith degraded proteoglycan. *Biochem. J.* **177**, 569-574 (1979).
- [60] Coudron, C., Ellis, K., Philipson, L., and Schwartz, N.B.: Preliminary characterization of a xylose acceptor prepared by hydrogen fluoride treatment of proteoglycan core protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **92**, 618-623 (1980).
- [61] Olson, C.A., Krueger, R., and Schwartz, N.B.: Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycan by hydrogen fluoride in pyridine. *Anal. Biochem.* **146**, 232-237 (1985).
- [62] Campbell, S.C., Krueger, R.C., and Schwartz, N.B.: Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycan and derived peptides. *Biochemistry* **29**, 907-914 (1990).
- [63] Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Rodén, L., and Fessler, J.H.: Silk – a new substrate for UDP-D-xylose:proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase. *Anal. Biochem.* **137**, 505-516, (1984).
- [64] Brinkmann, T., Weilke, C., and Kleesiek, K.: Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **272**, 11171-11175 (1997).
- [65] Weilke, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K.: Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin. Chem.* **43**, 45-51 (1997).
- [66] Weilke, C.: Dissertation: Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität in Körperflüssigkeiten. Universität Bielefeld. (1996).
- [67] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K.: Xylosylation of alternatively spliced isoforms of alzheimer APP by xylosyltransferase. *J. Prot. Chem.* **17**, 295-302 (1998).
- [68] Schwartz, N.B., and Rodén, L.: Biosynthesis of chondroitin sulfate. Purification of UDP-D-xylose:core protein beta-D-xylosyltransferase by affinity chromatography. *Carbohydr. Res.* **37**, 167-180 (1974).

- [69] Schwartz, N.B., and Dorfman, A.: Purification of rat chondrosarcoma xylosyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 136-144 (1975).
- [70] Esko, J.D., Weinke, J.L., Tayler, W.H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G., Gawish, A.: Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **262**, 12189-12195 (1987).
- [71] Cooper, T.C., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Berlin, New York: Walter de Gruyter (1981).
- [72] Lee, M.H., Lazo, J.S., Li, C.D., Hadfield, A.F., Maniglia, C.A., and Sartorelli, A.C.: Solubilization of murine melanoma xylosyltransferase and galactosyltransferase activities and their interaction by dialdehyde nucleosides. *Chem. Biol. Interact.* **41**, 141-53 (1982).
- [73] Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek K.: Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 919-924 (1999).
- [74] Kleesiek, K., Reinards, R., Okusi, J., Wolf, B., and Greiling, H.: UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase: a new marker of cartilage destruction in chronic joint diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **25**, 473-481 (1987).
- [75] Habuchi, O., and Miyata, K.: Stimulation of glycosaminoglycan sulfotransferase from chick embryo cartilage by basic proteins and polyamines. *Biochim. Biophys. Acta.* **616**, 208-217 (1980).
- [76] Habuchi, O., Matsui, Y., Kotoya, Y., Aoyama, Y., Yasuda, Y., and Noda, M.: Purification of chondroitin-6-sulfotransferase secreted from cultured chick embryo chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 21968-21974 (1993).
- [77] Habuchi, H., Habuchi, O., and Kimata, K.: Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 4172-4179 (1995).
- [78] Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K.: Purification and characterization of heparan sulfate 2-sulfotransferase from cultured Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 7645-7653 (1996).
- [79] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K.: Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose:proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoform XT II. *J. Mol. Biol.*, 2000 (in press).

- [80] Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K.: Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta. Derm. Venereol.* **80**, 60-61 (2000).
- [81] Wolf, B.: Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. (1982).
- [82] Pfeil, A.: Persönliche Mitteilung, Technische Universität Dresden. (1995).
- [83] Hirschel, M.D., and Gruenberg, M.L.: Large Scale Cell Culture Technology. Lydersen, B., eds.; Hanser Publishers: New York, 113-144 (1988).
- [84] Tyo, M.A., Bulbulian, B.J., Menken, B.Z., and Murphy T.J., Animal cell biotechnology. Spier, R.E., and Griffiths, J.B., eds.; New York: Academic Press **3**, 357-371 (1988).
- [85] Inoue, Y., Lopez, L.B., Kawamoto, S., Arita, N., Teruya, K., Seki, K., Shoji, M., Kamei, M., Hashizume, S., Shiozawa, Y., Tachibana, H., Ohashi, H., Yasumoto, K., Nagashima, A., Nakahashi, H., Suzuki, T., Imai, T., Nomoto, K., Takenoyama, M., Katakura, Y., and Shirahata, S.: Production of recombinant human monoclonal antibody using ras-amplified BHK-21 cells in a protein-free medium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 811-817 (1996).
- [86] Oegema, T.R. Jr., Kraft, E.L., Jourdan, G.W., and Van Valen, T.R.: Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* **259**, 1720-1726 (1984).
- [87] Fransson, L.A., Silverberg, I., and Carlsted, I.: Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. *J. Biol. Chem.* **260**, 14722-14726 (1985).
- [88] Sugahara, K., Mizuno, N., Okumura, Y., and Kawasaki, T.: The phosphorylated and/or sulfated structure of the carbohydrate-protein-linkage region isolated from chondroitin sulfate in the hybrid proteoglycans of Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor. *Eur. J. Biochem.* **204**, 401-406 (1992).
- [89] Sugahara, K., Ohi, Y., Harada, T., de Waard, P., and Vliegthart, J.F.: Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin-6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residues. *J. Biol. Chem.* **267**, 6027-6035 (1992).
- [90] Moses, J., Oldberg, A., Cheng, F., and Fransson, L.A.: Biosynthesis of the proteoglycan decorin-transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region. *Eur. J. Biochem.* **248**, 521-526 (1997).

- [91] Moses, J., Oldberg, A., and Fransson, L.A.: Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside. *Eur. J. Biochem.* **260**, 879-884 (1999).
- [92] Grebner, E.E., Hall, C.W., and Neufeld, E.F.: Glycosylation of serine residues by a uridine diphosphate-xylose: protein xylosyltransferase from mouse mastocytoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 391-398 (1966).
- [93] Telsler, A., Robinson, H.C., and Dorfman, A.: The biosynthesis of chondroitin-sulfate protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 912-919 (1965).
- [94] Wiggins, C.A., and Murno, S.: Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7945-7950 (1998).
- [95] Breton, C., and Imberty, A.: Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 563-571 (1999).
- [96] Gastinel, L.N., Cambillau, C., and Bourne, Y.: Crystal structures of the bovine  $\beta$ -4-galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J.* **18**, 3546-3557 (1999).
- [97] Gressner, A.M., and Bachem, M.G.: Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative disease: liver fibrosis as a paradigm. *Ann. Biol. Clin.* **52**, 205-226 (1994).
- [98] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provencano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 75-85 (1985).
- [99] Mita, K., Ichimura, S., and James, T.C.: Highly repetitive structure and its organisation of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* **38**, 583-592 (1994).
- [100] Hermanson, G.T., *Bioconjugate techniques*, San Diego: Academic press, Inc. (1996).
- [101] Sedmark, J.J., and Grossberg, S.E.: A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **79**, 544-552 (1977).
- [102] Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363 (1980).

- 
- [103] Kyhse-Andersen, J.: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biophys.Biochem.Methods* **10**, 203-209 (1984).
- [104] Gültekin, H., and Heermann, K.H.: The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329 (1988).
- [105] Rehm, H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1997).
- [106] Afeyan, N.B., Fulton, S.P, Regnier, F.E.: Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides. *J. Chromatogr.* **554**, 267-279 (1991).
- [107] Unger, K.K., *Handbuch der HPLC. Teil 2: Präparative Säulenflüssig-Chromatographie*, GIT Verlag, 29 (1994).
- [108] Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K., *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego, Academic Press, Inc. 264-265 (1992).
- [109] Jensen, O.N., Podtelejnikov, A., and Mann, M.: Delayed extraction improves specificity in database searches by matrix-assisted laser desorption/ionization peptide maps. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1371-1378 (1996).

## 10. Veröffentlichungen

### Publikationen:

- Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Xylosylation of alternatively spliced isoforms of alzheimer APP by xylosyltransferase. *J. Prot. Chem.* **17**, (1998).
- Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 919-924 (1999).
- Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta. Derm. Venereol.*, **80**, 60-61 (2000).
- Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose:proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoform XTII. *J. Mol. Biol.*, 2000 (in press).
- Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2000 (in press).

### Patente:

- Kuhn, J., Götting, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase, its isolation, characterization and diagnostic and therapeutic use.  
Patent 99 126 194.2, European Patent Office, Munich, 30 December, 1999.

### Abstracts und Posterpräsentationen:

- Weilke, C., Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Determination of human xylosyltransferase activity with recombinant bikunin as acceptor. 9<sup>th</sup> Joint Meeting of The Netherlands Society for Glycobiology The Groupe Lillois de Glycobiologie and

- The Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Lille, France, Abstractband O8, 1997.
- Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H.-R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Quantification of xylosyltransferase activities in human seminal plasma and ovarian follicular fluid. 9<sup>th</sup> Joint Meeting of The Netherlands Society for Glycobiology The Groupe Lillois de Glycobiologie and The Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Lille, France, Abstractband O6, 1997.
  - Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Glycosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase. 2<sup>nd</sup> French-Japanese Glycotechnology Meeting, Lille, France, Abstractband P13, 1998.
  - Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in scleroderma. 2<sup>nd</sup> French-Japanese Glycotechnology Meeting, Lille, France, Abstractband P14, 1998.
  - Götting, C., Sollberg, S., Huerkamp, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: a Biochemical Marker of the Sclerotic Process in Systemic Sclerosis. *J. Lab. Med.* 22 (11): 650, 1988.
  - Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Glycosylation of Alzheimer APP isoforms by xylosyltransferase. *J. Lab. Med.* 22 (11): 651, 1998.
  - Götting, C., Sollberg, S., Huerkamp, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: a Biochemical Marker of the Sclerotic Process in Systemic Sclerosis. 10<sup>th</sup> Joint Meeting, Nuland, Niederlande, 1.-3. November 1998, Abstractband O6, 1998.
  - Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Glycosylation of Alzheimer APP isoforms by xylosyltransferase. 10<sup>th</sup> Joint Meeting, Nuland, Niederlande, 1.-3. November 1998, Abstractband P2, 1998.
  - Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Huerkamp, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: a new serum marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37, S467, 1998.



- 
- Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: A biochemical marker of the sclerotic process in scleroderma. Kongreß für Laboratoriumsmedizin 1998, Düsseldorf, November, 1998.
  - Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Glycosylation of alzheimer APP isoforms by xylosyltransferase. Kongreß für Laboratoriumsmedizin 1998, Düsseldorf, November, 1998.
  - Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Huerkamp, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferase: a new serum marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. Ifcc Worldlab, Florenz, Italien, 6.-11. Juni 1999.
  - Kuhn, J., Götting, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Isolation and characterization of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase (XT) from JAR choriocarcinoma cell line. Meeting 2000 of the German Connective Tissue Society, Erlangen, 13 – 15 April, 2000.
  - Kuhn, J., Götting, C., Brinkmann, T., und Kleesiek, K., Isolierung und Identifizierung der Primärstruktur der humanen Xylosyltransferase. 5. Hj. Staudinger-Symposium 2000, 28 - 31 Mai 2000, Kloster Banz, Staffelstein.
  - Kuhn, J., Götting, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Purification and characterization of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase from JAR choriocarcinoma. 20<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium – ICS, August 27 – September 1, 2000, Hamburg, Germany.
  - Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Krieg, T., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., First isolation and cloning of human xylosyltransferase, the new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. International Symposium on Systemic Sclerosis (Scleroderma), September 16<sup>th</sup> to 17<sup>th</sup>, 2000, Kasteel Vaalsbroek, The Netherlands.
  - Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Xylosyltransferases: A novel protein family involved in the heparan sulfate biosynthesis. 12<sup>th</sup> Joint Meeting à Lille, November 5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup>, 2000, Lille, France.

- 
- Kuhn, J, Götting, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase from JAR choriocarcinoma cultured serum-free in hollow fiber bioreactors. 12<sup>th</sup> Joint Meeting à Lille, November 5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup>, 2000, Lille, France.
  
  - Kuhn, J., Götting, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., Immunodetection of human Xylosyltransferase. Kongreß für Laboratoriumsmedizin 2000, Düsseldorf, November, 2000.

## Lebenslauf

Name:	Kuhn	
Vorname:	Joachim	
Anschrift:	Kärntener Str. 14, 32547 Bad Oeynhausen	
Geburtsdatum, -ort:	13.10.63, Illingen/Saar	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	09.69 - 07.78	Grund- und Hauptschule in Lebach
	08.81 - 06.84	Berufsaufbauschule in Lebach
	09.84 - 06.88	Staatliches Abendgymnasium Saarbrücken
Berufsausbildung:	09.78 - 06.80	Ausbildung zum Elektroanlageninstallateur
	06.80 - 01.82	Ausbildung zum Energieanlagenelektroniker
Berufstätigkeit:	01.82 - 09.88	Grubenbetriebselektriker der Grube Ensdorf
Wehrdienst:	10.88 - 09.89	Fernmeldematerialmechaniker beim Heer
Studium:	10.89 - 01.95	Chemie, Universität des Saarlandes
	01.95 - 08.95	Mathematik, Universität des Saarlandes
Dissertation	seit 09.95	im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums NRW, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum