

**Untersuchungen zur
biochemischen Charakterisierung
der humanen Xylosyltransferase I und II**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Sandra Müller

aus Bielefeld

Bielefeld / Bad Oeynhausen

Januar 2005

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN-ISO 9706.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2005

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Professor Dr. med. Knut Kleesiek

am

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

Danksagung

Herrn Professor Dr. Knut Kleesiek möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen danken.

Herrn Professor Dr. J. Frey, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Christian Götting danke ich für Rat, Kritik und viele wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie für die ermutigende Betreuung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Thomas Brinkmann und Herrn Dr. Joachim Kuhn danke ich für Ihre Diskussionsbereitschaft und für die Zusammenarbeit.

Meinen Bürokolleginnen Frau Dipl.-Biol. Manuela Schöttler, Frau Dipl.-Biol. Sabine Siegling, Frau Dipl.-Biochem. Sylvia Schön und Frau Dipl.-Biol. Doris Hendig möchte ich für das gute Arbeitsklima, ständige Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft danken.

Allen Kollegen aus Labor 11, Herrn Dipl.-Biochem. Christian Prante, Frau Dipl.-Biochem. Veronika Schulz und Herrn Dipl.-Biochem. Elmar Thyzel möchte ich dafür danken, dass ich die letzten 3 Jahre in einem sehr guten Arbeitsklima verbringen konnte.

Für die Bereitstellung der Hefestämme und hilfreiche Anregungen danke ich Herrn Dr. Martin Farr.

Allen Mitgliedern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, vor allem Frau Alexandra Adam und Frau Anja Reuße-Kaup, danke ich für die Unterstützung und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Oliver Traue, auf seine Unterstützung, Geduld und sein Verständnis konnte ich mich jederzeit verlassen.

Bielefeld, im Januar 2005

Sandra Müller

Inhalt

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Glykosyltransferasen	2
2.2.	Proteoglykane	5
2.3.	Glykosaminoglykane	7
2.4.	Xylosyltransferasen	9
2.5.	Heparin-Bindung von Proteinen	11
3.	Aufgabenstellung	12
4.	Ergebnisse	13
4.0.	Expression der rekombinanten Xylosyltransferasen in Insektenzellen	13
4.1.	Darstellung und Charakterisierung der humanen XT-I	13
4.1.1.	Expression von XT-I in verschiedenen Insektenzelllinien	13
4.1.2.	Identifizierung essentieller Cystein-Reste der XT-I	15
4.1.2.1.	Analyse der XT-I-Aminosäuresequenz	15
4.1.2.2.	Gerichtete Mutagenese der Cystein-Reste von XT-I	17
4.1.2.3.	Immunologischer Nachweis mit Anti-V5-Antikörpern	18
4.1.2.4.	Quantifizierung der katalytischen Aktivität der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten	20
4.1.2.5.	Charakterisierung der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten	21
4.1.2.5.1.	Sensitivität gegenüber N-Phenylmaleimid	21
4.1.2.5.2.	Effekt von Disulfidreduzierenden-Reagenzien auf die Aktivität der Cystein-Mutanten und dem Wildtyp	22
4.1.2.5.3.	Inhibition mit Heparin und Bindung an immobilisiertem Heparin	23
4.1.2.5.4.	Inhibition mit UDP und Bindung an UDP- <i>Beads</i>	26
4.1.2.5.5.	Einfluss von Glykosaminoglykanen auf die enzymatische Aktivität der Cystein-Mutanten und der wt-XT-I	27
4.1.3.	Klonierung aminoterminaler XT-I-Mutanten und Expression in Insektenzellen	29

4.1.3.1.	<i>Alignment</i> der N-terminalen XT-I-Sequenzen aus verschiedenen Spezies	29
4.1.3.2.	Klonierung von N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten	30
4.1.3.3.	Expression der N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten in Insektenzellen	31
4.1.3.4.	Analyse der katalytischen Aktivität der N-terminal verkürzten Mutanten	32
4.1.3.5.	Charakterisierung der aminoterminalen XT-I-Mutanten	33
4.1.3.5.1.	Einfluß von DTT auf die enzymatische Aktivität der Mutanten	33
4.1.3.5.2.	Inhibition der N-terminalen XT-I-Mutanten durch Heparin	34
4.1.3.5.3.	Inhibition der XT-I-Mutanten mit UDP	35
4.1.3.5.4.	Einfluss von Heparan-Sulfat auf die Aktivität der aminoterminalen Mutanten	35
4.1.4.	Klonierung carboxyterminaler XT-I-Mutanten und Expression in Insektenzellen	35
4.1.5.	Enzymkinetik der XT-I-Varianten	36
4.1.5.1.	Bestimmung der K_M und v_{max} Werte der wt-XT-I und der XT-I-Mutanten	36
4.1.6.	Bestimmung der potentiellen Heparin-Bindungsstelle von wt-XT-I	38
4.1.6.1.	Western-Blot-Analyse der Bindung von wt-XT-I an Heparin unter Destruktion der dreidimensionalen Struktur	38
4.1.6.2.	Analyse der Primärsequenz der wt-XT-I nach potentiellen Bindungsmotiven	39
4.1.7.	N-Glykosylierungsmutanten	41
4.1.7.1.	Gerichtete Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen der XT-I	41
4.1.7.2.	Nachweis der Expression der N-Glykosylierungsmutanten und Bestimmung der relativen Aktivität	41
4.1.8.	Klonierung der humanen XT-II	42
4.1.8.1.	Klonierung der humanen XT-II in den Vektor pIB/V5-His-A	42
4.1.8.2.	Klonierung der humanen XT-II in den Vektor pMIB/V5-His-A	43
4.1.8.3.	Expression der humanen XT-II in <i>High-Five</i> -Insektenzellen	44
4.1.8.3.1.	Transiente Expression durch Liposomen-vermittelte Transfektion	44
4.1.8.3.2.	Darstellung von rekombinanter XT-II in <i>E.coli</i>	44
4.1.8.4.	Generierung eines stabilen XT-II-Klons in <i>High-Five</i> -Zellen	45
4.1.8.5.	Immunologischer Nachweis der XT-II-Expression	45
4.1.8.6.	Analyse der Genexpression mittels <i>Real-Time</i> PCR am <i>LightCycler</i>	47
4.1.9.	Untersuchung der XT-II-Aktivität	54
4.1.9.1.	Einsatz verschiedener Akzeptoren	54

4.2.	Untersuchungen zur Phylogenie der XT	56
4.2.1.	Homogenisierung von Hai-Geweben	56
4.2.2.	Bestimmung der XT-Aktivität	56
4.2.3.	Temperatur-Optimum der Hai-XT im Vergleich zur humanen XT-I	57
4.2.4.	Einfluss von Heparin auf die Aktivität	59
4.2.5.	Einfluss von UDP auf die Aktivität	59
4.2.6.	Einfluss von N-Phenylmaleimid	60
5.	Diskussion	61
5.1.	Identifizierung essentieller Cystein-Reste der XT-I	61
5.2.	Aminoterminaler XT-I-Mutanten und Heparinbindungsregion der XT-I	64
5.3.	Expression der humanen XT-II	67
5.4.	Analyse der XT aus <i>Prionace glauca</i>	69
5.5.	Ausblick	70
6.	Methoden	72
6.1.	Molekularbiologische Methoden	72
6.1.1.	Agarosegel-Elektrophorese	72
6.1.2.	Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	72
6.1.3.	DNA-Konzentrationsbestimmung	73
6.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion	73
6.1.4.1.	PCR-Temperaturzyklen	74
6.1.4.2.	Primersequenzen	75
6.1.5.	<i>Real-Time</i> PCR am <i>LightCycler</i>	76
6.1.5.1.	Sonden und Primer	77
6.1.5.2.	<i>Real-Time</i> Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) am <i>LightCycler</i>	78
6.1.6.	<i>Site directed mutagenesis</i>	79
6.1.6.1.	Primer für <i>in vitro</i> mutagenese	80
6.1.7.	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	81
6.1.8.	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	82
6.1.9.	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem <i>TOPO TA Cloning Kit</i>	82
6.1.10.	Nukleinsäureextraktion und –reinigung	83
6.1.10.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (<i>Escherichia coli</i>)	83
6.1.10.2.	Isolierung von genomischer-DNA aus Hefezellen	83
6.1.10.3.	Extraktion von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen	83
6.1.11.	RNA-Formamid-Agarosegelelektrophorese	84
6.1.12.	Synthese von cDNA durch Reverse Transkription	84

6.1.13.	DNA-Sequenzierung	85
6.2.	Proteinchemische Methoden	86
6.2.1.	Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität	86
6.2.1.1.	Solvatisierung von Seidenfibroin	86
6.2.1.2.	Radioaktiver Enzym-Aktivitätstest	86
6.2.1.3.	Radioaktiver Aktivitätstest in Gegenwart von Effektoren	87
6.2.1.4.	Bestimmung der Akzeptoreigenschaften von Peptiden und Proteinen	87
6.2.2.	Bestimmung des Proteingehalts in Zellkulturüberstand	87
6.2.3.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	88
6.2.4.	Chromatographische Techniken	89
6.2.4.1.	Gelfiltration	89
6.2.4.2.	Ni ²⁺ -Chelat Affinitätschromatographie	90
6.3.	Immunologische Methoden	90
6.3.1.	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	90
6.3.1.2.	Chloramphenicol Acetyltransferase-ELISA	90
6.3.2.	<i>Dot-Blot</i> auf PVDF-Membran	91
6.3.3.	Detektion immobilisierter Proteine mit Anti-V5-Antikörper	91
6.3.4.	Western-Blot	91
6.4.	Zellkultur	92
6.4.1.	Kultivierung von Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)	92
6.4.1.1.	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> in Flüssigkultur und auf Festmedien	92
6.4.1.2.	Kryokonservierung von <i>Escherichia coli</i>	92
6.4.1.3.	Transformation von TOP10-Zellen	92
6.4.1.4.	Bakterielle Proteinexpression	93
6.4.2.	Kultivierung von Hefezellen (<i>Pichia Pastoris</i>)	93
6.4.2.1.	Anzucht von <i>Pichia Pastoris</i> in Flüssigkultur und auf Festmedien	93
6.4.2.2.	Kryokonservierung von <i>Pichia Pastoris</i>	93
6.4.2.3.	Herstellung elektrokompetenter Hefezellen und Elektroporation	94
6.4.2.4.	Herstellung chemisch-kompetenter Hefezellen und Transformation	94
6.4.3.	Kultivierung von Insektenzellen	95
6.4.3.1.	Kulturmedien, Zusätze und Lösungen	95
6.4.3.2.	Kultivierung der verschiedenen Insektenzell-Linien	95
6.4.3.3.	Kryokonservierung von Insektenzellen	95

6.4.3.4.	Bestimmung der Zellzahl	96
6.4.3.5.	Transfektion von <i>High-Five</i> Zellen mit <i>Cellfectin</i>	96
6.4.3.6.	Selektion stabiler <i>High-Five</i> -Zellklone	96
6.4.3.7.	Transfektion von <i>Mimic cells</i> mit <i>Cellfectin</i>	97
6.4.4.	Kultivierung humaner und tierischer Zellen	98
6.4.4.1.	Kulturmedien und Zusätze	98
6.4.4.2.	Kultivierung der verschiedenen eukaryontischen Zelllinien	98
7.	Material und Geräte	99
7.1.	Insektenzelllinien	99
7.2.	Humane und tierische Zelllinien	99
7.3.	Hefestamm <i>Pichia pastoris</i>	99
7.4.	Bakterienstämme	100
7.5.	Vektoren	100
7.6.	Reagenziensätze	101
7.7.	Reagenzien	102
7.8.	Geräte	104
7.9.	Sonstige Materialien	104
8.	Abkürzungen	105
9.	Literatur	108
10.	Publikationen und Präsentationen	116

1. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Enzym Xylosyltransferase I (EC 2.4.2.26, XT-I), welches die Biosynthese von Glykosaminoglykanen in Proteoglykanen durch den Transfer von Xylose auf spezifische Serin-Reste des *Core*-Proteins initiiert und dem XT-II-Protein, dessen physiologische Funktion noch völlig unbekannt ist. Durch die Klonierung von unterschiedlichen XT-I-Mutanten konnte eine funktionelle Analyse der humanen XT-I beschrieben werden und es gelang im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die rekombinante Darstellung der humanen XT-II in Insektenzellen. Der Basisvektor pCG255 Δ 1-148-XT-I diente als Grundlage für die Etablierung von unterschiedlichen XT-I-Mutanten, welche für die Analyse der katalytischen Aktivität, der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat und der Identifizierung der Heparin-Bindungsregion eingesetzt wurden. Es wurden 14 hochkonservierte Cystein-Codons durch gerichtete Mutagenese zu Alanin-Codons mutiert und zusätzlich aminoterminal verkürzte XT-I-Deletionsmutanten generiert. Nach heterologer Expression in *High-Five*-Insektenzellen wurde die katalytische Aktivität der Enzyme quantifiziert, dabei konnten 5 Cystein-Reste als essentiell für die Erhaltung einer katalytisch aktiven XT-I bestimmt werden. Die Identifizierung des minimalen *Core*-Proteins der XT-I erfolgte durch Expression und funktionelle Analyse von aminoterminalen Deletionsmutanten. Deletion von 272 oder mehr aminoterminalen Aminosäuren führte zu nahezu vollständig inaktiven Enzymen, während Mutanten mit maximal 260 deletierten Aminosäuren eine zur rekombinanten XT-I vergleichbare Aktivität zeigten. Durch Western-Blot-Analyse konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die rekombinante XT-I in aktiver Form als Monomer vorliegt und keine Dimerisierung erfolgt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die rekombinante XT-I keine freien Cystein-Reste besitzt. Für die Heparin-Bindungsregion der XT-I konnte eine dreidimensionale Struktur ausgeschlossen und ein potientielles Sequenzmotiv in Position Pro⁷²¹ bis Ile⁷²⁷ beschrieben werden.

Die humane XT-II wurde innerhalb dieser Arbeit erstmalig rekombinant in *E.coli* und in *High-Five*-Zellen exprimiert und ein stabiler Insektenzellklon konnte etabliert werden. Die Bestätigung der Spezifität der XT-II-Klone erfolgte durch den immunochemischen Nachweis der Xylosyltransferasen im Zellkulturüberstand mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen ein XT-I-homologes Peptid und einem monoklonalen Anti-V5-Antikörper. Die XT-I- und XT-II-Genexpression der Insektenzellklone konnte durch eine *Real-Time* PCR-Methode quantifiziert werden. Durch die rekombinante Expression konnte die Grundlage für die Aufklärung der Funktion der XT-II geschaffen werden.

Für phylogenetische Untersuchungen der Xylosyltransferasen wurde das XT-Enzym einer evolutionär alten Spezies analysiert. Die XT aus dem Blauhai ist ebenso wie die humane XT-I *in vitro* dazu in der Lage, Xylose auf Seidenfibroin zu transferieren. Im Unterschied zum humanen Enzym erwies sich der Akzeptor Bikunin für die Hai-XT als nicht geeignet, ein weiterer Unterschied zeigte sich bei der Analyse der Inhibition durch Heparin. Hai-XT zeigte auch bei Zusatz von 1000 IU/ml Heparin noch eine Restaktivität von 83%, während bei der humanen XT-I schon 1 IU/ml Heparin für eine vollständige Inhibition ausreichen. Die Inhibition durch UDP erfolgte vergleichbar dem humanen Enzym und lässt daraus schließen, dass die Bindungsregion für den Nukleotid-Zucker evolutionär hochkonserviert ist.

2. Einleitung

2.1 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind an der Biosynthese von hoch variablen Glykokonjugaten beteiligt wie sie in Bakterien, Pflanzen und tierischen Zellen vorkommen. Die Synthese der Glykokonjugate wird katalysiert durch den Transfer eines aktivierten Zuckers auf ein Akzeptor-Molekül zur Initiierung oder zur Elongation von Saccharidketten. Dabei weisen alle Glykosyltransferasen eine hohe Substrat- und Akzeptorspezifität auf [1] und werden entsprechend in verschiedene Familien unterteilt. Bei dem Akzeptor kann es sich um das nicht-reduzierende Ende einer wachsenden Oligosaccharidkette, um ein Protein oder um ein Lipid handeln [2]. Abhängig von der Glykosyltransferase kann dieser Prozess unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum erfolgen. Eine Klassifizierung der Glykosyltransferasen erfolgt nach der Art des transferierten Zuckers in Glukosyltransferasen, Galaktosyltransferasen, Fukosyltransferasen, Xylosyltransferasen, N-Acetylglukosaminytransferasen, N-Acetylgalaktosaminytransferasen und Sialyltransferasen. Aufgrund der hohen Spezifität der Glykosyltransferasen und der großen Zahl unterschiedlicher Oligosaccharidstrukturen in Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen, Polysacchariden und deren Derivaten wird die Zahl der Glykosyltransferasen auf weit über 100 geschätzt [3, 4].

Der Vergleich der deduzierten Aminosäuresequenz der bisher untersuchten Glykosyltransferasen zeigt, dass diese Enzyme nur über eine geringe Sequenzhomologie verfügen [5]. Trotz der divergenten Primärstruktur besitzen Glykosyltransferasen eine sehr ähnliche Domänenstruktur [6]. Es sind Typ II Membranproteine mit einer kurzen, aminoterminalen cytoplasmatischen Region, einer hydrophoben Transmembran-Domäne, einer Stamm-Region und einer großen, katalytisch aktiven, globulären Domäne [2, 7]. Obwohl nur geringe Sequenzhomologien innerhalb der Glykosyltransferasen vorliegen, konnten bei den Sialyltransferasen kurze konservierte Domänen identifiziert werden, die an der Substraterkennung beteiligt sind [8, 9]. Ein weiteres Sequenzelement, welches bei prokaryontischen sowie eukaryontischen Formen der Glykosyltransferasen auftritt, ist das DxD-Motiv [5, 10], welches an der Kationen-vermittelten Anlagerung des aktivierten Zuckers beteiligt ist. Ein homologes Golgi-Retentionssignal der Glykosyltransferasen konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden [11].

Die Mehrzahl der Glykosyltransferasen in Eukaryonten sind im Lumen des endoplasmatischen Retikulums oder im Golgi-Apparat lokalisiert. Nicht membranständige, lösliche Formen der Glykosyltransferasen sind im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten

zu finden und werden durch proteolytische Spaltung der katalytischen Domäne freigesetzt [3, 4]. Eine Erhöhung des Serumspiegels konnte z.B. während pathologischer und inflammatorischer Prozesse beschrieben werden [12, 13]. Der biochemische Mechanismus der Proteolyse ist bei vielen Glykosyltransferasen noch völlig unbekannt.

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Glykosyltransferasen, die z.B. an der Synthese von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin involviert sind, kloniert werden. Es wurde eine Datenbank angelegt, in der die Glykosyltransferasen nach Sequenz und Stereochemie in Familien eingeteilt werden und die bis heute 75 Glykosyltransferase-Familien umfasst [14]. Die dreidimensionale Struktur von mehreren Glykosyltransferasen konnte durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, wobei bisher hauptsächlich 2 verschiedene Strukturen beschrieben wurden (Abb. 1).

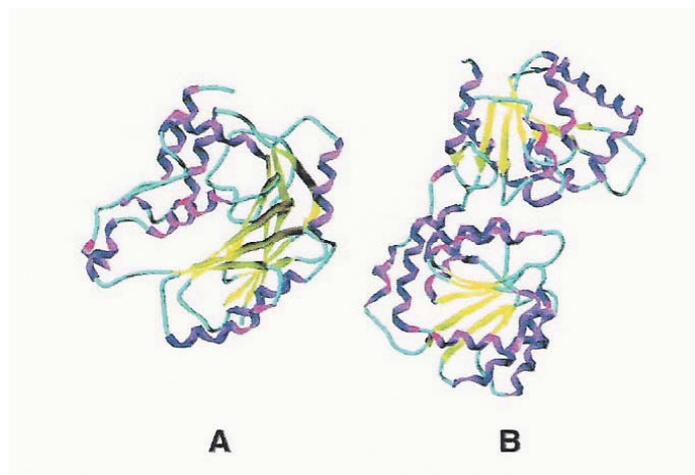


Abb. 1: Darstellung der beiden dreidimensionalen Strukturen [15], die man bisher in der Familie der Glykosyltransferasen vorwiegend finden konnte. Zum Typ A gehört das *Spsa* Protein aus *Bacillus subtilis* [16], Typ B stellt z.B. das *MurG* Protein aus *Escherichia coli* dar, eine membranassoziierte Glykosyltransferase, die an der Peptidoglykan-Biosynthese beteiligt ist [17].

Glykosyltransferasen vom Typ A besitzen parallele β -Faltblätter, die an beiden Seiten von α -Helices flankiert werden und verfügen über eine N-terminale Glykonukleotid-Bindungsregion sowie eine C-terminale Akzeptor-Bindungsregion [18]. Im Gegensatz dazu zeigen Glykosyltransferasen vom Typ B, die ebenso zur α/β -Familie gehören, zwei Rossmann-ähnliche Domänen, welche durch eine tiefe Spalte getrennt sind. Die Analyse der 3-D Strukturen liefert eine Fülle von Informationen über Substrat-Bindung, -Spezifität

und mögliche katalytische Mechanismen für die meisten der bekannten Glykosyltransferasen [19-21].

Viele Glykosyltransferasen besitzen in der Primärstruktur hoch konservierte Cystein-Reste, die sowohl inter- wie auch intramolekulare Disulfidbrücken bilden können [22-25]. Für die humane Glukuronyltransferase konnte im Jahr 2000 gezeigt werden, dass dieses Enzym als Homodimer organisiert vorliegt, wobei ein Cystein-Rest aus der Stamm-Region für die Dimerisierung essentiell ist [26]. Disulfidbrücken dienen der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der Glykosyltransferasen, ebenso wie sie für die katalytische Aktivität der Transferasen von Bedeutung sein können [27, 28].

2.2 Proteoglykane

Proteoglykane, eine große Gruppe von glykosylierten Proteinen, die von den meisten eukaryontischen Zellen synthetisiert werden, sind heterogene Makromoleküle deren Untereinheiten aus Polysacchariden und Proteinen bestehen. Sie stellen sowohl strukturell wie auch funktionell vielfältige Komponenten der perizellulären und extrazellulären Matrix dar [29]. Proteoglykane bestehen aus einem 10-500 kDa großen Core-Protein, an das kovalent bis zu 100 unverzweigte, aus repetitiven Disaccharideinheiten aufgebaute Glykosaminoglykanseitenketten gebunden sind (Abb. 2) [30].

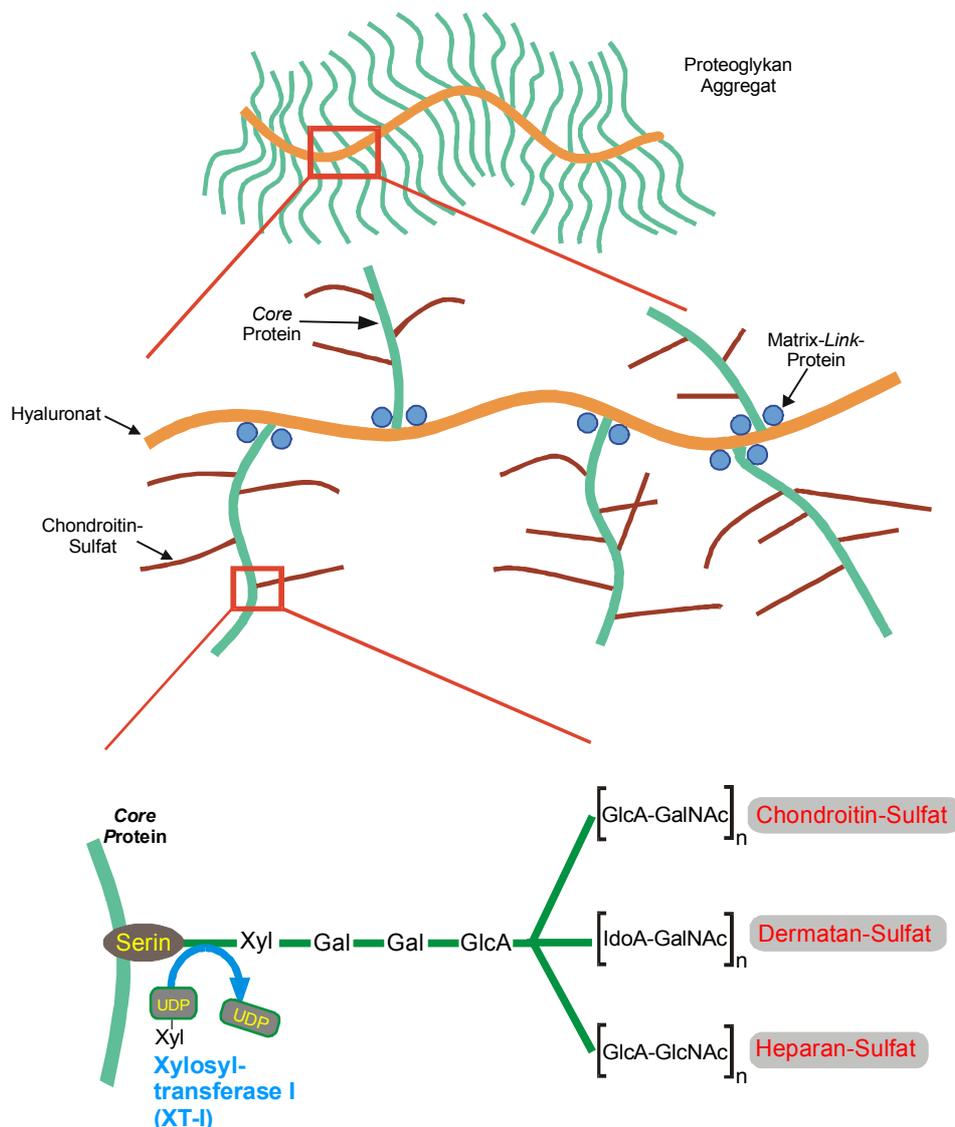


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Proteoglykan-Aggregats.

Das Proteoglykan Core-Protein ist substituiert mit unterschiedlichen Glykosaminoglykanen wie Chondroitin-Sulfat oder Dermatan-Sulfat. Ein Matrix-Link-Protein vermittelt die nicht-kovalente Bindung an Hyaluronat. XT-I transferiert Xylose auf bestimmte Serin-Reste des Core-Proteins.

Aufgrund struktureller und funktioneller Charakteristika lassen sich die Proteoglykane in Familien einteilen, wobei die verschiedenen *Core*-Proteine und die Struktur der Polysaccharidketten für die hohe Diversität verantwortlich sind [31]. Die Polysaccharidketten variieren sowohl in Anzahl, Länge und Sulfatierungsmuster. Proteoglykane können intrazellulär in sekretorischen Granula, auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix vorkommen. Sie sind an vielen essentiellen Vorgängen in der Zelle beteiligt und ihre biologischen Funktionen reichen von einfacher mechanischer Stützfunktion und Strukturgebung bis hin zu einer Beteiligung bei Prozessen wie Differenzierung, Morphogenese, Zelladhäsion und Proliferation [31]. Proteoglykane beeinflussen ebenso das Tumorzellwachstum wie sie auch eine Rolle spielen bei der Zellinvasion durch Viren und Bakterien [32].

Die Biosynthese der Proteoglykane beginnt mit der Transkription der *Core*-Protein-Gene im Nukleus, wobei nach Synthese und Prozessierung der mRNA die Translation an den membrangebundenen Polysomen des rauen endoplasmatischen Retikulums erfolgt [33]. Der initiale Schritt der Synthese der Glykosaminoglykanseitenketten findet wahrscheinlich posttranslational auf dem Weg vom rauen ER zum Golgi-Apparat statt. Nach der Translokation zum Golgi-Kompartiment erfolgt hier die alternierende Polymerisation der Polysaccharidketten durch den Transfer aktivierter Zucker sowie eine Sulfatierung mittels aktiviertem Sulfat [34], anschließend werden die Proteoglykane zu ihren Zielorten transportiert.

An der Strukturgebung beteiligte Proteoglykane, wie z.B. Aggrecan aus dem Knorpel, sind gut untersucht und verleihen durch die starke Hydratisierung der polyanionischen Glykosaminoglykane Gelenken und Geweben mechanische Belastbarkeit und Elastizität [35]. Sie enthalten vornehmlich Chondroitinsulfat, Dermatansulfat oder Keratansulfat, wobei die Glykosaminoglykanseitenketten etwa 90% der gesamten Masse des Proteoglykans ausmachen. Die nicht-kovalente Bindung des *Core*-Proteins an ein langes Hyaluronatfilament wird durch ein *Matrix-Link*-Protein stabilisiert [36].

Eine bedeutsame Rolle beim Aufbau der extrazellulären Matrix besitzen offensichtlich kleine, leucinreiche Proteoglykane wie z.B. Decorin, Biglykan und Fibromodulin mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Bei den Proteoglykanen Decorin und Fibromodulin konnte bei *in vitro* Versuchen eine Interaktion mit den Kollagen-Typen I und II nachgewiesen werden. Biglykan bindet dagegen nicht an Kollagen, sondern akkumuliert an der Zelloberfläche und im perizellulären Raum [29, 37].

Heparansulfat-Proteoglykane sind ubiquitär auf Zelloberflächen und in der extrazellulären Matrix präsent [38, 39] und interagieren mit Wachstumsfaktoren, sind an der Internalisation von Liganden beteiligt [40] und in Prozesse des kardiovaskulären Systems wie z.B. Angiogenese, Thrombose, Neovaskularisation und Proliferation der glatten Muskulatur involviert [41, 42]. Einige pathogene Bakterien, Viren und Protozoen können über heparansulfatbindende Adhäsionsmoleküle an Proteoglykane auf der Zelloberfläche binden, wodurch eine Invasion des Pathogens in die Wirtszelle erleichtert wird [43-45].

2.3 Glykosaminoglykane

Die Struktur der Glykosaminoglykane besteht aus repetitiven Disaccharideinheiten, die ein Derivat eines Aminozuckers (Glukosamin oder Galaktosamin) und einer Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) enthalten (Abb. 3). Da einige der Hydroxylgruppen des Aminozuckers mit Sulfat verestert sind [46], ergibt sich in Kombination mit den Carboxylatgruppen eine hohe negative Ladungsdichte. Die Minimierung einer sterisch ungünstigen Ladungsverteilung erfordert die Ausbildung langgestreckter Polymerketten, welche die charakteristische Konformation der Polysaccharide zur Folge hat.

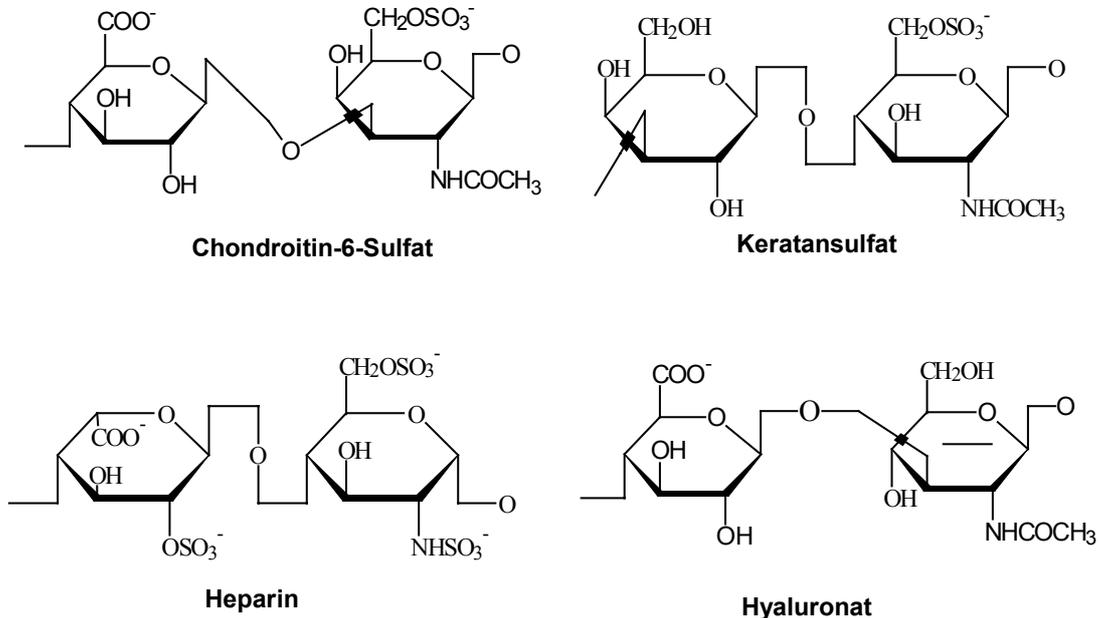


Abb. 3: Strukturformeln der Disaccharideinheiten der Glykosaminoglykane Chondroitin-6-Sulfat, Keratansulfat, Heparin und Hyaluronat.

Durch Sulfatierung an verschiedenen Positionen zeigen alle Glykosaminoglykane eine erhebliche Sequenzheterogenität.

Die Biosynthese der Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat, Heparansulfat und Heparin findet in den intrazellulären Kompartimenten des ER und des Golgi-Apparates statt [47]. Die Glykosaminoglykane sind über eine uniforme *Linker*-Region mit einem Serin-Rest des *Core*-Proteins verbunden. XT-I initiiert die Synthese der Saccharid-*Linker*-Region, dessen Struktur aus vier Saccharid-Einheiten (GlcA- β (1 \rightarrow 3)Gal- β (1 \rightarrow 3)Gal- β (1 \rightarrow 4)Xyl- β →O-Ser) besteht. Es folgt der enzymatische Transfer zweier Galaktose-Moleküle und einer Glukuronsäure auf das xylosylierte *Core*-Protein (Abb. 4). Die wiederholte Addition von Disacchariden führt schließlich zur Bildung der langen, heteropolymeren Ketten. Letztlich werden diese Seitenketten modifiziert durch N-Deacetylierung, N- oder O-Sulfatierung und durch Epimerisierung von Glukuronsäure zu Iduronsäure [47].

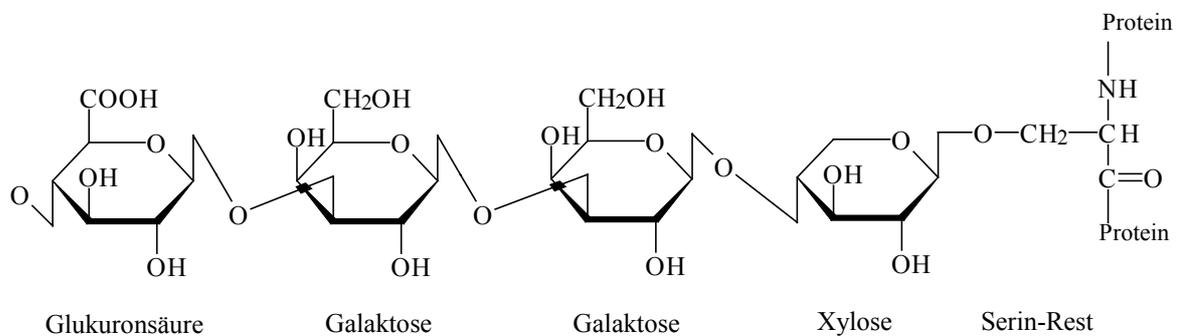


Abb. 4: Die Synthese der Saccharid-*Linker*-Struktur.

Diese beginnt mit der von der XT-I katalysierten Übertragung von Xylose auf einen spezifischen Serin-Rest des Proteoglykan-*Core*-Proteins. Es folgt der enzymatische Transfer von zwei Galaktose-Molekülen und einer Glukuronsäure.

Chondroitinsulfat besteht aus einer alternierenden Abfolge von N-Acetylgalaktosamin und Glukuronsäure. Der Aminozucker kann durch verschiedene Sulfotransferasen an den Positionen C4 oder C6 sulfatiert werden, wonach Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat unterschieden werden. Die Epimerisierung an Position C5 der Glukuronsäure führt zur Bildung von Dermatan sulfat [31].

Keratan sulfat kann an das *Core*-Protein über verschiedene Saccharid-*Linker* gebunden werden, entweder O-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste oder N-glykosidisch an Asparaginreste. Es besitzt zudem vergleichsweise kurze Dissacharidketten [47].

Heparansulfat und Heparin werden durch die Addition von Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin am Saccharid-*Linker* des *Core*-Proteins synthetisiert. Sie werden zunächst als Proteoglykane ohne Sulfatgruppen gebildet, anschließend partiell deacetyliert und N- oder O-sulfatiert [31]. Die Glukosaminreste im Heparin sind vornehmlich N-sulfatiert, während im Heparansulfat ein variables Substituentenmuster gefunden wird [48-50].

Die Biosynthese von Hyaluronat unterscheidet sich von der anderer Glykosaminoglykane. Sie findet nicht in intrazellulären Kompartimenten, sondern an der inneren Oberfläche der Plasmamembran statt [51, 52]. Das plasmamembranständige Enzym HA-Synthase katalysiert die alternierende Addition von Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin [53-55].

2.4 Xylosyltransferasen

Die Xylosyltransferase I (EC 2.4.2.26) katalysiert den Transfer einer Xylose von UDP-Xylose auf bestimmte Serin-Reste eines *Core*-Proteins [56] und initiiert somit die Synthese der gemeinsamen *Linker*-Region von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin. Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Biosynthese der Glykosaminoglykane dar [57]. Die Xylosylierung des *Core*-Proteins durch XT-I erfolgt posttranslational im endoplasmatischen Retikulum und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt [58, 59]. Ebenfalls konnte eine regulatorische Funktion der XT-I bei der Chondroitinsulfat-Synthese gezeigt werden [60].

Nur ein Teil der Serin-Reste in Proteoglykanen wird von XT-I erkannt und glykosyliert. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der Modifikationsstellen in Chondroitinsulfat-Proteoglykanen konnte eine Consensus-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren a-a-a-a-Gly-Ser-Gly-a-b-a (a=Asp oder Glu, b=Gly, Asp oder Glu) für die XT-I-vermittelte Xylosylierung identifiziert werden [61-63]. Für die Entwicklung spezifischer Testsysteme für die XT-I ist diese Consensus-Sequenz von großer Bedeutung. Bevor diese Sequenz bekannt war, wurden deglykosylierte Proteoglykane aus Knorpel als Akzeptorsubstrat verwendet [61]. Die extremen Reaktionsbedingungen, die für die Deglykosylierung notwendig sind, führten jedoch zu schlecht reproduzierbaren Gemischen unterschiedlich fragmentierter Proteine [64-67]. Als Akzeptor wurde schließlich Seide von *Bombyx mori* verwendet [68], die *in vivo* nicht glykosyliert vorliegt, aber *in vitro* unter bestimmten Reaktionsbedingungen von XT-I erkannt wird. Seidenfibrin enthält das repetitive Hexapeptid S-G-A-G-A-G, welches bereits die Consensus-Sequenz für die Xylosylierung durch XT-I enthält.

Eine unabdingbare Voraussetzung für die biochemische und funktionelle Charakterisierung der XT-I ist eine präzise und sensitive Methode zur Quantifizierung der XT-I Aktivität. Diese erfolgt durch einen radiochemischen Aktivitätstest, bei dem die XT-I-vermittelte Modifikation eines Akzeptorproteins durch Inkorporation von [¹⁴C]-Xylose detektiert wird [69]. Durch die Verwendung von rekombinanten Bikunin, der inhibitorischen Komponente des Inter- α -Trypsin-Inhibitors, konnte ein sensitives Testverfahren entwickelt werden, welches die Quantifizierung der XT-I-Aktivität mit großer Präzision und Richtigkeit ermöglicht [62, 70].

Die Analyse der Primärstruktur der XT-I zeigt die Zugehörigkeit dieses Enzyms zu der Glykosyltransferase Familie 14. Die Mitglieder dieser Familie besitzen eine gemeinsame homologe Region von ca. 300 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne, die vermutlich bei der Bindung von UDP-Zucker Donoren beteiligt ist [71]. Trotz der ähnlichen Domänenstruktur zeigen selbst Glykosyltransferasen, die zur gleichen Familie gehören, nur wenige homologe Aminosäuresequenzen. Dagegen zeigt der Vergleich der Sequenzen ein und derselben Glykosyltransferase verschiedener Spezies größere Homologien [6, 72]. Aufgrund der geringen Sequenzhomologien hat sich die Aufklärung des präzisen katalytischen Mechanismus als sehr diffizil erwiesen und wurde bisher noch nicht für die XT-I beschrieben.

XT-I spielt bei verschiedenen physiologischen und pathobiochemischen Prozessen eine Rolle. Als initierendes Enzym der Synthese von Glykosaminoglykanen ist XT-I maßgeblich an dem Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Für den Erhalt der Integrität und der Funktion des Herzens besitzt die extrazelluläre Matrix eine bedeutende Rolle. Durch verschiedene Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix einen wichtigen Faktor darstellt [73, 74]. In anderen Untersuchungen konnte bereits früher gezeigt werden, dass die XT-I zusammen mit Proteoglykanen sezerniert wird und die Quantifizierung der humanen Xylosyltransferase-Aktivität im Serum als klinisch-chemischer Marker der Proteoglykansynthese geeignet ist [75, 76].

Zusätzlich zum XT-I Gen besitzen höhere Organismen ein weiteres Gen, welches für die Xylosyltransferase II codiert, ein Protein mit hoher Homologie zu XT-I [77]. Die humane XT-II zeigt auf Aminosäure-Ebene 55% Identität zur humanen XT-I, wobei mehrere hochkonservierte Sequenzbereiche im zentralen Bereich der Proteine auch zwischen verschiedenen Spezies auffällig sind. Aufgrund der hohen Homologie ist zu vermuten,

dass es sich bei XT-II ebenfalls um eine Glykosyltransferase handelt, ihre spezifische Aktivität konnte jedoch bis heute nicht ermittelt werden.

2.5 Heparin-Bindung von Proteinen

Die humane Xylosyltransferase I besitzt eine hohe Affinität zu Heparin und es konnte gezeigt werden, dass sich XT-I durch die Bindung an eine Heparin-Matrix durch Affinitätschromatographie aufreinigen lässt [77-79].

Die Analyse der Struktur von bekannten Heparin- und Heparan-Sulfat-bindenden Proteinen hat die Präsenz von konservierten Motiven aufgezeigt, durch welche die Bindung an Glykosaminoglykane vermutlich vermittelt wird. Cardin und Weintraub haben zwei basische Aminosäure-Cluster identifiziert, in denen die Aminosäuren nach dem Muster *XBBXB*X oder *XBBBXXB*X vorliegen, wobei *B* = eine basische Aminosäure, meist Arginin oder Lysin, und *X* = eine ungeladene oder hydrophobe Aminosäure repräsentieren [80]. Durch molekulares *Modelling* dieser Consensus-Sequenzen konnten α -helikale oder β -Faltblatt Strukturen als Umgebung der basischen Cluster ermittelt werden. Diese Sekundärstrukturen erlauben die Anordnung von basischen Resten an einer Seite der Helix, so dass eine geladene Domäne entsteht an die Glykosaminoglykane binden können. Tatsächlich konnte auch für einige Heparin-bindende Proteine gezeigt werden, dass die Zerstörung der Consensus-Sequenz die Bindung an Heparin verhindert, z.B. erfolgt in Thrombospondin oder auch in Fibronectin die Bindung an Heparin nach Veränderung der basischen Sequenz nur noch stark vermindert oder ist ganz aufgehoben [81, 82]. Außerdem wurde diskutiert, dass eine Distanz von etwa 20 Angström zwischen basischen Resten notwendig ist, um die Bindung an Heparin zu ermöglichen [83]. Durch Untersuchungen mit Peptiden, die der Consensus-Sequenz entsprachen, konnte man zeigen, dass diese Peptide eine hohe Affinität für Heparin und Proteoglykane aus Endothelzellen aufweisen [84].

3. Aufgabenstellung

Die Xylosyltransferase I katalysiert den initialen Schritt der Proteoglykan-Biosynthese und stellt ein zentrales Enzym beim Aufbau von Bindegewebsstrukturen dar. Ein XT-I-homologes Protein, welches als XT-II bezeichnet wird, stellt vermutlich ebenfalls eine Glykosyltransferase dar, deren Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen aber noch völlig unbekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine funktionelle und biochemische Charakterisierung der humanen XT-I und XT-II erfolgen. Für die Untersuchung von Substrat-Protein-Wechselwirkungen und die Analyse potentieller inhibitorischer Substanzen werden beide Xylosyltransferasen als rekombinante Proteine in größeren Mengen in löslicher Form benötigt. Daher sollte zunächst das bereits für XT-I etablierte Expressionssystem in Insektenzellen optimiert werden. Auf dieser Grundlage sollte eine Strategie für die Klonierung von Deletionsmutanten der XT-I entwickelt werden, die für die Analyse der Nukleotid-Bindungsregion, der Heparin-Bindungsstelle und des minimalen *Core*-Enzyms der XT-I genutzt werden können. Die Rolle der Cystein-Reste bei der Bildung von Disulfidbrücken sollte durch gerichtete Mutagenese aufgeklärt werden.

Da für die humane XT-II noch kein Expressionssystem etabliert war, sollte zunächst eine Strategie für die Expression in Insektenzellen aufgestellt werden. Dabei war zu beachten, dass die rekombinante XT-II möglichst leicht aufgereinigt werden kann und in katalytisch aktiver Form für weitere Analysen vorliegt. Zur Charakterisierung der rekombinanten XT-II und ihrer möglichen katalytischen Funktion sollten verschiedene potentielle Xyloseakzeptoren im radiochemischen Aktivitätstest eingesetzt werden.

Untersuchungen zur Phylogenie der Xylosyltransferasen sollten durch die Analyse der XT einer evolutionär sehr alten Spezies, wie den Knorpelfischen, durchgeführt werden. Dafür sollte die XT aus dem Blauhai (*Prionace glauca*) auf Wechselwirkungen mit verschiedenen Substraten untersucht werden und mit der humanen XT-I verglichen werden.

4. Ergebnisse

4.0. Expression der rekombinanten Xylosyltransferasen in Insektenzellen

Die rekombinante Darstellung und Charakterisierung der humanen Xylosyltransferasen erfolgte in mehreren Teilschritten:

1. Durch molekularbiologische Techniken wurde die humane XT-I-cDNA mutiert und die exprimierten Enzyme funktionell analysiert;
2. das minimale *Core*-Protein für eine katalytisch aktive Form der XT-I wurde durch Klonierung von N-terminalen-Deletionsmutanten untersucht;
3. in Insektenzellen wurde ein Expressionssystem für die humane XT-II etabliert.

4.1. Darstellung und Charakterisierung der humanen XT-I

Für die funktionelle und biochemische Charakterisierung, die Untersuchung von Substrat-Protein-Wechselwirkungen und die Analyse potentieller inhibitorischer Substanzen werden die humane XT-I und XT-II in größeren Mengen in löslicher Form benötigt. Deshalb sollte zunächst das bereits in *High-Five*-Zellen etablierte Expressionssystem mit dem Vektor pCG255 für XT-I optimiert und die Expression in weiteren Insektenzelllinien verglichen werden.

4.1.1. Expression von XT-I in verschiedenen Insektenzelllinien

High-Five-Zellen sind Ovarzellen der Zelllinie BTI-TN-5B-1-4 und stammen ursprünglich aus dem Kohlweissling *Trichoplusia ni*. Bei *Mimic cells* handelt es sich um transgene Insektenzellen, die aus Sf9 entwickelt wurden, um eine säugerzellähnliche Glykosylierung von rekombinanten Proteinen zu ermöglichen. Insektenzellen sind wie andere eukaryontische Zellen dazu in der Lage, ihre Proteine durch N-Glykosylierung zu modifizieren, jedoch ursprünglich nur vom mannosereichen Typ. Durch die stabile Integration von verschiedenen Glykosyltransferasen sind *Mimic cells* zur Addition der Monosaccharide N-Acetylglukosamin, Galaktose und Sialinsäure und damit zur Ausbildung komplexer N-verknüpfter Oligosaccharide fähig.

Die Optimierung der transienten Transfektion erfolgte bei allen drei getesteten Zelllinien durch Variation der Konzentration an Plasmid-DNA des Vektors pCG255XT-I und der eingesetzten Liposomenmenge. Die Menge an eingesetzter Plasmid-DNA wurde von 3 –

10 µg pro Transfektionsansatz variiert, das Volumen der Liposomen von 3 – 10 µl. Während der 5tägigen Inkubationszeit kam es zu einem kontinuierliche Anstieg der XT-I-Aktivität im Zellkulturüberstand bis auf maximal ca. 250 mU/l bei den *High-Five*-Zellen, was einer spezifischen Aktivität von 35 mU/g Protein entsprach.

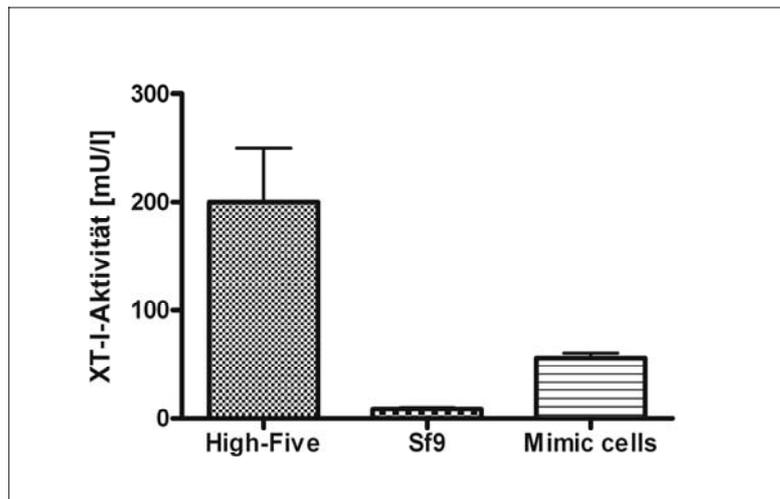


Abb. 5: Vergleich des Expressionsniveaus von wt-XT-I in verschiedenen Insektzelllinien.

Die drei Insektzelllinien *High-Five*, *Sf9* und *Mimic cells* wurden mit dem Vektor pCG255XT-I transient transfiziert und die Expression nach 5tägiger Inkubation quantifiziert. Bei den *High-Five*-Zellen konnte eine bis zu 5fach höhere XT-I-Aktivität im Vergleich zu den *Mimic cells* detektiert werden.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden die folgenden Analysen und Expressionen von rekombinanten Proteinen in *High-Five*-Zellen durchgeführt.

4.1.2. Identifizierung essentieller Cystein-Reste der XT-I

4.1.2.1. Analyse der XT-I-Aminosäuresequenz

Zur Identifikation von konservierten Cystein-Resten wurde ein *Alignment* mit sieben XT-I-Sequenzen aus verschiedenen Spezies durchgeführt. Das *Alignment* wurde mit Hilfe der Programme *ClustalX* und *Genedoc* unter Verwendung der folgenden Sequenzen erstellt:

<i>Homo sapiens</i> XT-I	Genbank Accession Nr.: AJ277441 [77]
<i>Mus musculus</i> XT-I	Genbank Accession Nr.: AJ291750
<i>Rattus norvegicus</i> XT-I	Genbank Accession Nr.: AJ295748 [77]
<i>Anopheles gambiae</i> XT	Ensembl Gen ENSANGG00000003504
<i>Fugu rubripes</i> XT-I	Ensembl Gen SINFRUG00000122544
<i>Drosophila melanogaster</i> XylT	Genbank Accession Nr.: NM_139448
<i>Caenorhabditis elegans</i> XT	Genbank Accession Nr.: AJ496235

In der Aminosäuresequenz der XT-I von Mensch und Maus finden sich insgesamt 15 Cys-Reste, die über beide Spezies hoch konserviert sind und an der Ausbildung von Disulfidbrücken potentiell beteiligt sein können. Die Primärsequenzen von *Fugu*, *Drosophila*, Mosquito und *C.elegans* weisen 14 Cys-Reste auf, die ebenso eine sehr hohe Homologie zu den anderen beiden Spezies besitzen. In der Region der N-terminalen Domäne des Enzyms besitzen 5 Cysteine eine geringere Homologie, hingegen sind die Reste Cys⁴⁷¹, Cys⁵⁴², Cys⁵⁶¹, Cys⁵⁶³, Cys⁵⁷², Cys⁵⁷⁴, Cys⁹²⁰ und Cys⁹³³ vollständig in allen untersuchten Spezies konserviert (Abb. 6).

human_XTI : MVAAPARRLARRSHSALLAALVLLQLTLVWNFSLDSGAGERRGAAVGGGQPPAPRPRRRDLPAEAAAAGGGGGGGGGGGPQARAGGGGPEPRGQPASRGALPARA : 120
mouse_XTI : MVAAPARRLARRSHSALLAALVLLQLTLVWNFSLDSGAGERRGAAVGGGQPPAPRPRRRDLAAHLPAARGGPGGRAGGGG-----ARGGGPGGARAQPASRGALASRA : 113
rat_XTI : ----- : -
Fugu_XT : ----- : -
drosophila : -----RAKHVPASSPOLITDHSPHARPDSSGAASRLWQRRLQKPLEIQLAMEQSVARWLKRYPAFFLLLLIVAIQLFLAYK : 79
mosquito_X : -----MQKPLRLLRKYVFLVIGFMIVAGVFLAYK : 32
C.elegans : -----MLFNGTTRKYDAIYISLFLFLNVLNLYLN : 29



human_XTI : LDPHPSPLITLETQDGYFSHRPKKVKRTDSNN-ENSVPKDFENVD-NSNFAPRTQKQKHQPELAKKPPSRQKELLKRLKEQEKKGHTFPKGGP-GEVLPDRAAANS SHGKDVSRPP : 237
mouse_XTI : RDPQPSPLITLETQDGYFSHRPKKVKRTDSNN-ENSVPKDFENVD-NSNFAPRTQKQKHQPELAKKPPSRQKELQKRLKLDALDKRQGGSVLGGK-KEVLPPEKATGNSSQKDLSPHS : 230
rat_XTI : -----YFSHRPKKVKRTDSNN-ENSVPKDFENVD-NSNFAPRTQKQKHQPELAKKPPSRQKELQKRLKLDALDKRQGGSVLGGK-KEVLPPEKATGNSSQKDLSPHS : 101
Fugu_XT : -----QDIYFSHRPKKVKRTDSNN-ENSVPKDFENVD-NSNFAPRTQKQKHQPELAKKPPSRQKELQKRLKLDALDKRQGGSVLGGK-KEVLPPEKATGNSSQKDLSPHS : 100
drosophila : SLDIVGGGSGSGFDAAEAPASPPPPHQAQARVQPPARTKLTAAQLGQPECCDILAPAEIASALQAKTKDCREHIAQIACAIQAGRFYAPQLFSSCP-AGNHTANVSLGCFKDEKDPRLLAG : 198
mosquito_X : LLRMLPSGNESSAERLDRKLYDKDKLQPNQHVLRDELDELVEVPCPELTKRETYSALHRAKSSQCKAKIVEVACEIQAGKFPORLPTFC-RGDSENALRGCFRDEKDFRLLSG : 148
C.elegans : -----TAQHTQVGNKHSISDSGKTSNPLPSCETITDLDLAKSAISRAITPSCAKALQLEACQKNGTFTINFENQCFNHSRLDQFICGLFKKEARVLTE : 127

human_XTI : HARKTGGSSPETKYDQPKKDISGK---EASALSRAKSKHCRQEIGETYCRHKLGLL--MPEKVTRECPLEGGKANKN-VQWDEDSVEYMPA-----NPVRIAFVLVHGRASRQLQR : 344
mouse_XTI : HARKSGGGSPETKSDQAPKDISGK---EASALSRAKSKHCRQEIGETYCRHKLGLL--MPEKVTRECPLEGGKANKN-VQWDEDAVEYMPA-----NPVRIAFVLVHGRASRQLQR : 338
rat_XTI : HSRKSGGGSPETKSDQVPKDISGK---EASALSRAKSKHCRQEIGETYCRHKLGLL--MPEKVTRECPLEGGKANKN-VQWDEDAVEYMPA-----NPVRIAFVLVHGRASRQLQR : 209
Fugu_XT : EKMAVELPTGSELKREQ-POGEISGK---EASALSRAKSGRQOIAQVYQKHKERAL--MPEKVTRECPLEGGKANKN-VQWDEDAVEYMPA-----NPVRIAFVLVHGRASRQLQR : 207
drosophila : YSSSSTNSPAKVELLQSGYYPAGVQYGRECFGYDPPKASKLPDSSONTKCLGN--AKEIQQGYAMNIYETGI-AKFTAQLAATTPSEET---KRVIAFLTLNLRALRQVHR : 312
mosquito_X : YSSTFKTNSPEKIRBLQSGYYPAGVQYGRECFGYDPPKASKLPDSSONTKCLGN--AKEIQQGYAMNIYETGI-AKFTAQLAATTPSEET---KRVIAFLTLNLRALRQVHR : 232
C.elegans : FEYKLPKSNKATCRKHQKAGFLYFLEGFEGECPGNDVSNATAVDVVEPRAYKCPGNENSEEPGGNAVEIFRTGFRSKVNRHKTPTLPPSSDSIKNPVKLLFLQLNGRNERQVKR : 247

human_XTI : MFKAIYHKDHFYIYHVKRNSYLHRQVLQVSRQYSNVVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 453
mouse_XTI : MSKAIYHKDHFYIYHVKRNSYLHRQVLQVSRQYSNVVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 457
rat_XTI : MFKAIYHKDHFYIYHVKRNSYLHRQVLQVSRQYSNVVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 328
Fugu_XT : LFKAIYHTSHYIYHVDQRSSYLHREVLSLATQYENVRVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 326
drosophila : LLKALYAPHEVYIYHVDQRSSYLHREVLSLATQYENVRVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 430
mosquito_X : LLKALYSPHHYIYHVDQRSSYLHREVLSLATQYENVRVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 381
C.elegans : FLKSIYLPHHYIYHVDQRSSYLHREVLSLATQYENVRVTPWFMATIWGASLLSTYLQSMRD-LLEMTDWFDFINLSAADYPIRTNDQLVAFLSFYRIMNFKSHGRDNARFIRKQG : 367

human_XTI : LDRLFLCDDAHMWRLDGRIPEGIADVGGSDWFLNRRFEVYVAFS---TDDLVTMKQFYSYTLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 578
mouse_XTI : LDRLFLCDDAHMWRLDGRIPEGIADVGGSDWFLNRRFEVYVAFS---TDDLVTMKQFYSYTLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 572
rat_XTI : LDRLFLCDDAHMWRLDGRIPEGIADVGGSDWFLNRRFEVYVAFS---TDDLVTMKQFYSYTLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 443
Fugu_XT : LDRLFLCDDAHMWRLDGRIPEGIADVGGSDWFLNRRFEVYVAFS---TDDLVTMKQFYSYTLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 441
drosophila : LDKTFVCDTHMWRIGDRKLPAGIQVDGSDWVLSRPFVGVYVTHE--REDDELQALLKFRHTLLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 547
mosquito_X : LDMTFVCDTHMWRIGDRKLPAGIQVDGSDWVLSRPFVGVYVTHE--REDDELQALLKFRHTLLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 500
C.elegans : FEYVFECDTHMWRIGDRKLPAGIQVDGSDWVLSRPFVGVYVTHE--REDDELQALLKFRHTLLPAESFFHTVLENSPHDPTMVDNLRITNWNPKLGGKCC-YKHIVVWGGSPND : 482

human_XTI : FKPDQFHRFQQAR---PTFFARKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 691
mouse_XTI : FKPDQFHRFQQAR---PTFFARKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 685
rat_XTI : FKPDQFHRFQQAR---PTFFARKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 556
Fugu_XT : FKPDQFHRFQQAR---PTFFARKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 556
drosophila : FKPELWRLQATEQR---SLFFARKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 648
mosquito_X : FSELDWERLQASQHK---KLFFGRKFEAVVQEIIGQLDSYLSGN--YPAGTGLPSYWNVYDEP-DGHSLSDVTLTYHSFARLGLRRAETSLSHTD-GENSFYPMGHFVSHVLYFL : 604
C.elegans : FREETMKFELQKAIKSPYFARKFDSMVDISIAEAEMQISPEKQLNHPYTHFAFANI PKTG-----IDEQKLFHESLANFALKSTETRAKFRKVLRIDALRAHNN : 586

human_XTI : ADRFQGLIKHHVATNLAASKLETLETWMPKVKFVIAASPPDFGRQFSEVGTDDWDAKERLFRNFGLGPMDEP-----VGMQKWKGG-PNVTVTVIWDVFNVIATYDILIE : 800
mouse_XTI : ADRFQGLIKHHVATNLAASKLETLETWMPKVKFVIAASPPDFGRQFSEVGTDDWDAKERLFRNFGLGPMDEP-----VGMQKWKGG-PNVTVTVIWDVFNVIATYDILIE : 794
rat_XTI : ADRFQGLIKHHVATNLAASKLETLETWMPKVKFVIAASPPDFGRQFSEVGTDDWDAKERLFRNFGLGPMDEP-----VGMQKWKGG-PNVTVTVIWDVFNVIATYDILIE : 665
Fugu_XT : SDQFQGYLVRAATNHAASQTESLETWTPRDHFTLAKPFPNHNLRQHIQVGTDDWDAKERLFRNFGLGPMDEP-----VGMQKWKGG-PNVTVTVIWDVFNVIATYDILIE : 666
drosophila : RDQYKGLVRYR- GSTGKFLHLETRVPTQOGLARNARFKRLNFEVSTDFDQKEQIARNFGLGPMDEP-----VGMQKWKGG-PNVTVTVIWDVFNVIATYDILIE : 763
mosquito_X : RDTYRGLVRAEAM-QGTG-WSLELETWISPVVAKVTRSTPLARLHLEVSTEYDEKEQLSRNPRPIGTAEPALIFRLAPPLETEKRVKGNATHSLAVEIIPDVGTVVAASHFTIE : 722
C.elegans : ALIEVMKIEITDGTAEFLHRLSHVNLTENEEKLVEHG---YLLRAVSGTGFPEWKEELCREYMGFVTDNDTL-----HTRLQGHPTHEVKKV-----D : 675

human_XTI : S--TAEFTHYKPLN-----LPLRPQVTVKILHHVVPVAETHKFLVAPLTFSNR-----QPIKPEEALKLHNGPLRANAYMEQSFQSLNPLVSLPINAQVQEQARNAASTGTALEGW : 905
mouse_XTI : S--TAEFTHYKPLN-----LPLRPQVTVKILHHVVPVAETHKFLVAPLTFSNR-----QPIKPEEALKLHNGPLRANAYMEQSFQSLNPLVSLPINAQVQEQARNAASTGTALEGW : 899
rat_XTI : S--TAEFTHYKPLN-----LPLRPQVTVKILHHVVPVAETHKFLVAPLTFSNR-----QPIKPEEALKLHNGPLRANAYMEQSFQSLNPLVSLPINAQVQEQARNAASTGTALEGW : 770
Fugu_XT : T--STEVTYRPELPL-----LPLRPQVTVKILHHVVPVAETHKFLVAPLTFSNR-----QPIKPEEALKLHNGPLRANAYMEQSFQSLNPLVSLPINAQVQEQARNAASTGTALEGW : 771
drosophila : DSTSDVINHSKTLK-----HPITPQIWTAKLIGRNSIYALQFLIAPLAPLYYK-----YPLAKSSDAEALNAGLTVLPEDFEMPEVWQQLQTDDEQFTREESLAKMLGQELPFW : 873
mosquito_X : DSPTGLHSHFNHLKAGKLLPLAEGVWAGRLKLLGATFLVTEATFTREGRVVENELLEHPHTQVLPVRRGSTANTATSKIRAKERKQHPVHSGDRHRLDHWQEDDQQHQ : 842
C.elegans : KTSPEMIFKRYKGD-----LIEQVTVKPYDSVPGG-----QFDSWVWVKLLSNLTTCSNPFVDDISPSPPDAPPLATLHFVTVTQNAHC : 757

human_XTI : LDSLVTGWTAMDICATGPTACP---VMQTSQTAWSSESPDKSELGAVKPDGRLR-- : 959
mouse_XTI : LDSLVTGWTAMDICATGPTACP---VMQTSQTAWSSESPDKSELGAVKPDGRLR-- : 953
rat_XTI : L---VGGTWTAMDICATGPTACP---VMQTSQTAWSSESPDKSELGAVKPDGRLR-- : 821
Fugu_XT : LHGLLEGHWSAADVCSMGESACP---VMQRCRLTAWSSASPPDKSELKPPREDGRIR-- : 825
drosophila : IDGLVQFQOLRESQVVEADS---EVSPLPQSDAFWSSSLADPKSDVDALLK----- : 922
mosquito_X : LNKLVQFQFIREQAVAGVERKELVRFVLDKSTWSWSSLAADPKSDVDALLK----- : 894
C.elegans : HVDYLRQFQKIADEFTS-----GDACKEKIWSYTPDPSKSDIVFGVDEDDQTILI : 806

Abb. 6: Alignment von XT-I-Sequenzen aus verschiedenen Spezies.

Die Aminosäuresequenz der XT-I aus sieben Spezies ist nach einem Sequenzvergleich zur Identifikation von konservierten Cystein-Resten dargestellt. Verwendet wurde die humane Sequenz (human_XT-I), Maus (mouse_XT-I), Ratte (rat_XT-I), Drosophila, Wurm (*C.elegans*), Mosquito und Kugelfisch (*fugu* XT). Die hoch-konservierten Cystein-Reste sind hervorgehoben, wobei die erste Aminosäure der rekombinanten XT-I durch einen Pfeil markiert ist.

4.1.2.2. Gerichtete Mutagenese der Cystein-Reste von XT-I

Die humane XT-I ist ein Protein mit 959 Aminosäuren und insgesamt 15 Cystein-Resten. Der rekombinanten XT-I fehlt die cytoplasmatische N-terminale Region und damit auch der Cystein-Rest in Position 6. Da das Protein mit hoher enzymatischer Aktivität in *High-Five*-Zellen exprimiert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit 14 Cystein-Reste auf ihre Funktion für die katalytische Aktivität und die Ausbildung von Disulfidbrücken untersucht.

Die 14 Cystein-Reste der humanen XT-I wurden mit der Methode der *site-directed* Mutagenese in Alanin-Reste mutiert. Es wurden 14 Expressionsvektoren hergestellt, in denen individuell jeweils 1 Cys-Rest mutiert wurde. Zur Änderung der Codons sind jeweils 2 Basenaustausche erforderlich, deren Erfolg durch Sequenzierung überprüft wird. Die Cystein-Mutanten der XT-I konnten in *High-Five*-Zellen mit ähnlicher Ausbeute im Vergleich zur wt-XT-I exprimiert werden.

4.1.2.3. Immunologischer Nachweis mit Anti-V5-Antikörpern

Die Zellkulturüberstände der exprimierten Cystein-Mutanten wurden für eine erste Charakterisierung im SDS-PAGE aufgetrennt und durch *Electroblotting* auf eine PVDF Membran übertragen. Die Proteine wurden zunächst unter reduzierenden Bedingungen analysiert, um die Proteinmenge und die Größe vergleichen zu können. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Anti-V5-Antikörpern, die spezifisch an das V5-Epitop am C-terminalen Ende der rekombinanten Fusionsproteine binden. Alle untersuchten rekombinanten Proteine wurden in entsprechend ähnlicher Menge exprimiert und weisen eine Einzelbande bei ca. 90 kDa auf (Abb. 7 B).

Eine Analyse der Cystein-Mutanten-Proteine unter nichtreduzierenden Bedingungen ergab eine Auftrennung der Proteinbanden mit leicht unterschiedlicher Mobilität. Die Mutanten C276A und C301A wanderten mit einer Doppelbande nahe bei 100 kDa (Abb. 7C). Die C257A, C285A und C542A Mutanten zeigten im Western-Blot unter nativen Bedingungen ein leicht verringertes Molekulargewicht um ca. 5 kDa im Vergleich zur wt-XT-I. Die Substitution der Cystein-Reste bei diesen drei Mutantenzymen bewirkte eine geringfügig größere Mobilität der Proteine im Gel, die durch den Verlust von Disulfidbrücken und damit teilweise der Tertiärstruktur verursacht wird. Keine abweichenden Laufeigenschaften im Vergleich zur wt-XT-I zeigten die Mutanten C675A, C920A, C927A und C933A, die ebenso als eine Einzelbande erscheinen. Unter den nativen Auftrennungsbedingungen ist die Doppelbande der C574A Mutante besonders auffällig, da eine zusätzliche Bande mit ca. 20 kDa geringerem Molekulargewicht als die wt-XT-I Bande auftritt.

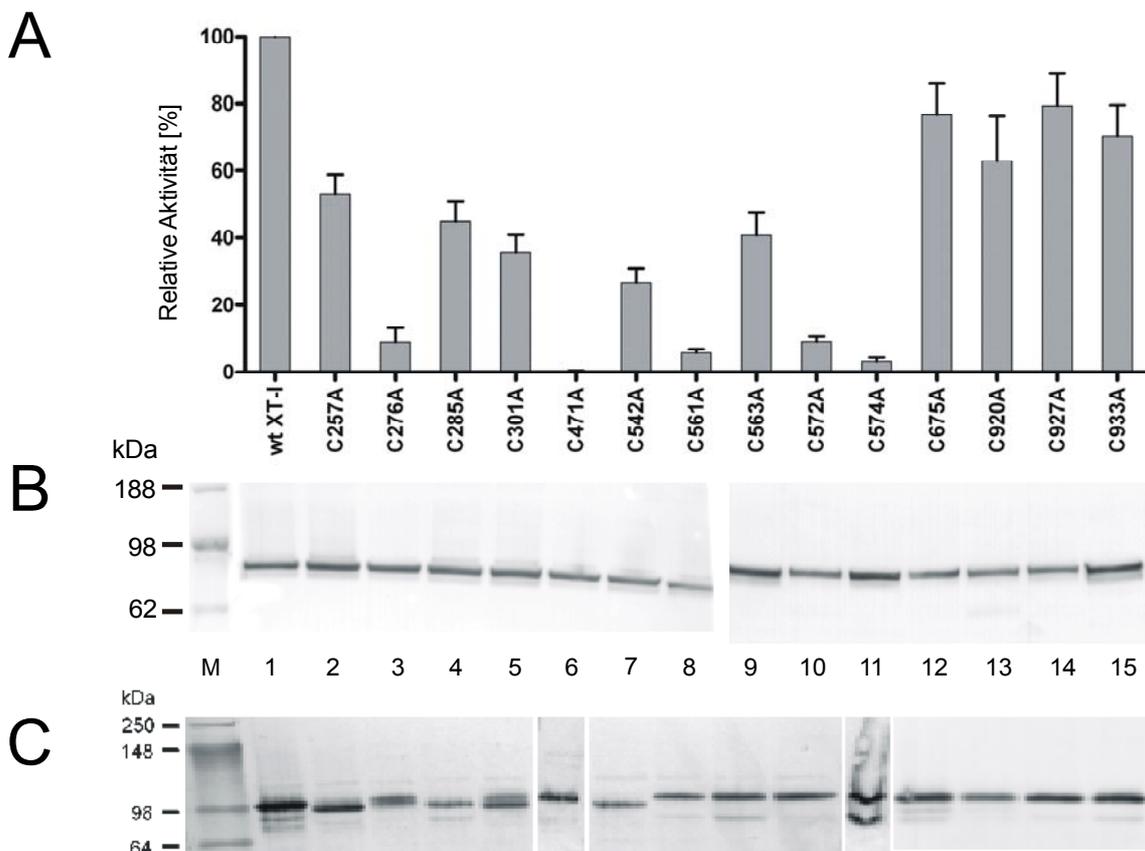


Abb. 7: XT-I-Aktivität von wt-XT-I und den 14 Cystein-Mutanten.

- A) Darstellung der relativen XT-I-Aktivität, wobei die wt-XT-I-Aktivität als 100% definiert wurde. Das Balkendiagramm zeigt die relative Aktivität der jeweiligen Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Expressionsexperimenten mit jeweils 2 aus unabhängigen Klonen erhaltenen Plasmid-Vektoren.
- B) Western-Blot unter reduzierenden Bedingungen mit 50fach konzentrierten Zellkulturüberstand von wt-XT-I (Spur 1) und den 14 Cystein-Mutanten (Spur 2-15), Spur M: Marker. Die Detektion erfolgte mit Anti-V5-Antikörpern, die spezifisch für das V5-Epitop der Fusionsproteine sind.
- C) Western-Blot unter nativen Bedingungen und immunologischer Nachweis der Mutanten-Enzyme und des Wildtyps. Die Proben mit 50fach konzentrierten Zellkulturüberstand wurden in einem 8-16 %igen Tris-Glycin Gel aufgetrennt und mit Anti-V5-Antikörpern detektiert.

4.1.2.4. Quantifizierung der katalytischen Aktivität der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten

Im XT-I-Aktivitätstest wird der Xylosetransfer von UDP-[¹⁴C]Xylose auf einen spezifischen Akzeptor gemessen. Die Menge der eingebauten, radioaktiv markierten Xylose ist dabei proportional zur Enzymaktivität.

Die Aktivität der Cystein-Mutanten wurde in Standard-XT-I-Aktivitätstests quantifiziert. Als Positiv-Kontrolle wurde der Wildtyp jeweils in einem parallelen Ansatz exprimiert und die Aktivität bestimmt. Bei fünf der Cystein-Mutanten, C276A, C471A, C561A, C572A und C574A, konnte ein nahezu vollständiger Verlust an katalytischer Aktivität festgestellt werden (Abb. 7A). Vorwiegend Cystein-Mutanten aus der N-terminalen Region, C257A, C285A und C301A zeigen einen Aktivitätsverlust zwischen 40-60%. Mutationen in Cys-Resten nahe der C-terminalen Region der XT-I haben nur einen sehr geringen Einfluss auf die Enzymaktivität, obwohl auch diese Cysteine in Säugern, Insekten und wirbellosen Tieren hoch konserviert sind.

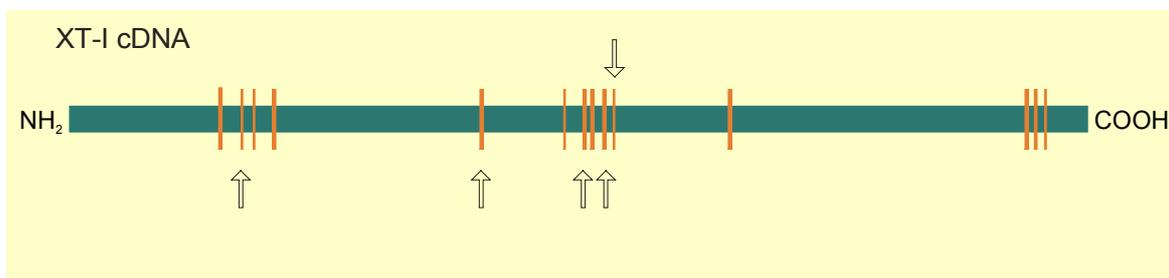


Abb. 8: Schematische Darstellung der Verteilung der Cystein-Reste in der XT-I-cDNA.

Cystein-Reste, deren Mutation zu Alanin zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust des Enzyms führen, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Cystein-Reste mit essentieller Bedeutung für die Erhaltung der katalytischen Aktivität der XT-I liegen vorwiegend in der mittleren Sequenzregion in einem Cluster von vier Resten lokalisiert (Abb. 8). Ein weiterer Cystein-Rest ist nahe dem N-Terminus gelegen und ebenso essentiell für die katalytische Aktivität.

4.1.2.5. Charakterisierung der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten

4.1.2.5.1. Sensitivität gegenüber N-Phenylmaleimid

Die humane XT-I ist ein Enzym mit 15 Cystein-Resten und besitzt daher 7 potentielle Disulfidbrücken. Zur Analyse der Anzahl der vorhandenen Disulfidbrücken in XT-I wurde das rekombinante Protein mit einem für Sulfhydryl-Gruppen spezifischen Reagenz inkubiert. Es wurden Konzentrationen von 0-20 mM N-Phenylmaleimid eingesetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt. Das Wildtyp-Enzym zeigte auch bei einer Konzentration von 20 mM N-Phenylmaleimid keinen Verlust an Aktivität (Abb. 9), was darauf schließen lässt, dass keine freien Sulfhydryl-Gruppen für die Reaktion mit N-Phenylmaleimid zugänglich sind. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass in der wt-XT-I insgesamt sieben Disulfidbrücken vorliegen und die Aktivität nicht auf der Präsenz von freien Thiolgruppen basiert.

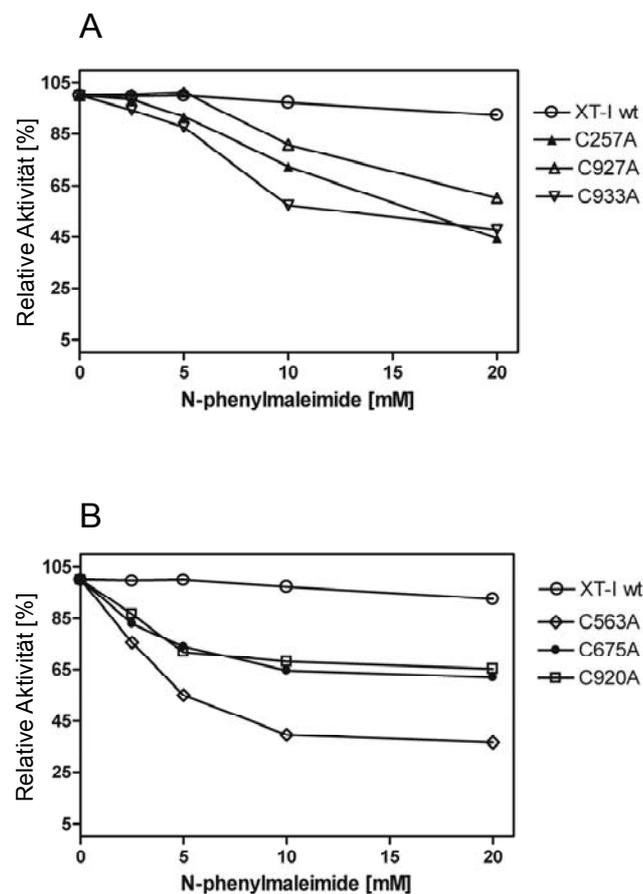


Abb. 9: Einfluß von N-Phenylmaleimid, einem Sulfhydryl-Gruppen spezifischen Reagenz, auf die Aktivität der wt-XT-I.

Rekombinante XT-I und Cystein-Mutanten wurden mit 0-20 mM N-Phenylmaleimid inkubiert und anschließend die Enzym-Aktivität quantifiziert. Bild A und B zeigen die Variation der Aktivität in Abhängigkeit von der Reagenzkonzentration. Das Wildtyp-Enzym zeigt keine Veränderungen in der Aktivität, während die Mutanten-Enzyme einen kontinuierlichen Verlust der Aktivität aufweisen.

4.1.2.5.2. Effekt von Disulfidreduzierenden-Reagenzien auf die Aktivität der Cystein-Mutanten und dem Wildtyp

Die Rolle der Disulfidbrücken für die Tertiärstruktur und die Erhaltung der Enzymfunktion der humanen XT-I wurde durch den Zusatz von DTT in einem Bereich von 0-40 mM analysiert. Die Ergebnisse für die wt-XT-I ergeben einen Verlust von 95% Enzymaktivität bei der höchsten Konzentration von 40 mM DTT, daher liegt die Bedeutung der Cystein-Reste wohl eher in der Erhaltung der Proteinstruktur, als das sie an katalytischen Reaktionen beteiligt sind.

Zusätzlich sollte bei fünf nahezu inaktiven Cystein-Mutanten analysiert werden, ob bei diesen sich die Enzymaktivität regenerieren lässt. In der Literatur ist die Aktivierung durch den Zusatz von reduzierenden Agentien zu inaktiven mutierten Enzymen beschrieben worden [85]. Das Fehlen bestimmter Cystein-Reste könnte bei den Mutanten zu einer inkorrekten Tertiärstruktur führen, die evtl. unter leicht reduzierenden Bedingungen durch Rückfaltung zu einer Aktivierung der enzymatischen Aktivität führen könnte. Die C276A, C471A, C561A, C572A und C574A Mutanten wurden mit 2,5 mM DTT inkubiert und die Enzymaktivität im XT-Test bestimmt. Keine der getesteten Enzym Mutanten konnte durch den Zusatz von DTT aktiviert werden.

Bei den Mutanten mit einer verbliebenden Restaktivität von ca. 10% fiel bei diesen Experimenten eine unterschiedliche Sensitivität für sehr geringe DTT-Konzentrationen auf. In weiteren Analysen mit den C276A, C561A und C572A Mutanten mit DTT-Konzentrationen von 0-2,5 mM konnte dieser Unterschied bestätigt werden (Abb. 10). Die jeweilige Aktivität einer Mutante ohne DTT-Zusatz wurde als 100% definiert. Da von den getesteten Mutanten keine einen Anstieg der Aktivität aufzeigte, lässt sich aus diesem Ergebnis folgern, dass durch den Verlust jeweils einer dieser fünf Cystein-Reste die Proteinstruktur so nachhaltig zerstört ist, dass keine korrekte Faltung des Enzyms möglich ist.

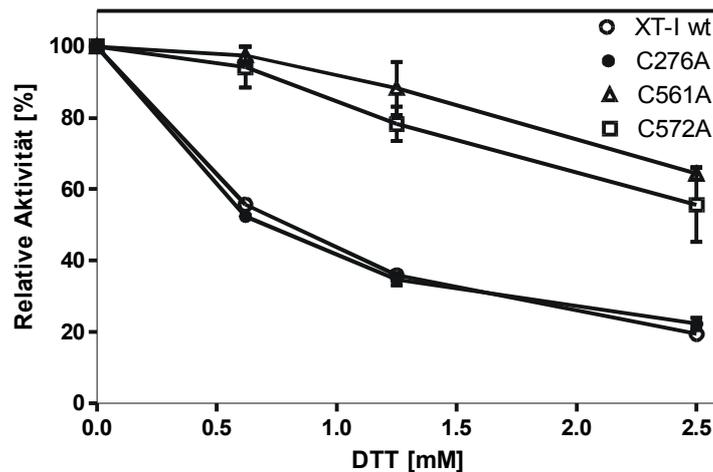


Abb. 10: Einfluß von DTT auf die Enzymaktivität.

Dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Aktivität als Funktion von der DTT-Konzentration in einem Bereich von 0-2,5 mM. Analysiert wurden Cystein-Mutanten-Enzyme mit einer Restaktivität von ca. 10%. Auffällig ist die unterschiedliche Sensitivität der Mutanten für sehr geringe Konzentrationen an DTT.

Für eine Anzahl von Glykosyltransferasen wurde in der Literatur die Ausbildung von Dimeren über Disulfidbrücken beschrieben [26, 86-89]. Um eine mögliche Dimerisierung der humanen XT-I zu untersuchen, wurde das rekombinante wt-Protein im SDS-PAGE unter reduzierenden und nativen Bedingungen aufgetrennt und durch Immunofärbung detektiert (Abb. 7B+C, Spur 1). Beide Analysen ergaben nur eine erkennbare Einzelbande bei ca. 100 kDa für das Wildtyp-Protein, daher scheint die humane XT-I eher als Monomer zu existieren und keine intramolekularen Disulfidbrücken auszubilden.

4.1.2.5.3. Inhibition mit Heparin und Bindung an immobilisiertem Heparin

In früheren Studien konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Heparin ein nicht-kompetitiver Inhibitor der humanen XT-I darstellt und das Enzym durch Heparinaffinitätschromatographie aufgereinigt werden kann [77-79]. Der inhibitorische Effekt von Heparin auf die generierten Cystein-Mutanten sollte in Aktivitätstests untersucht werden. Aufgrund der geringen Restaktivität konnten die C471A, C561A und C574A Mutanten nicht analysiert werden. Der Zusatz von 1 IU/ml Heparin führte beim Wildtyp-Enzym zu >70% Aktivitätsverlust, eine Konzentration von 100 IU/ml Heparin bewirkte einen vollständigen Funktionsverlust bei der humanen XT-I. Die 11 getesteten Cystein-Mutanten konnten alle durch den Zusatz von Heparin in einem Bereich von 1-100

IU/ml ähnlich der wt-XT-I inhibiert werden (Abb. 11). Der inhibitorische Effekt auf die C276A Mutante war dagegen signifikant ($p < 0,05$) verstärkt.

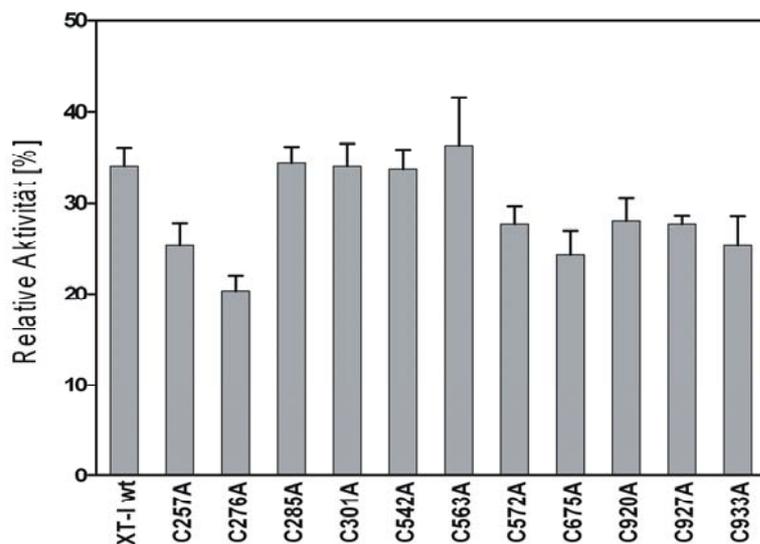


Abb. 11: Inhibitorischer Effekt von 1 IU/ml Heparin auf die enzymatische Aktivität. Die signifikant verstärkte Inhibition der C276A Mutante ist dargestellt ($p < 0,05$).

Für weitere Untersuchungen wurde an Agarose-Beads immobilisiertes Heparin eingesetzt. Zellkulturüberstand mit rekombinantem Protein wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit den Heparin-Beads inkubiert und anschließend die Aktivität im Überstand quantifiziert. Zur Vermeidung falsch-negativer Resultate, durch während der Inkubationszeit freigesetztes Heparin, wurden mehrere Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden Heparin-Beads parallel in PBS-Puffer inkubiert und eine Probe des Überstandes zu einer XT-I-Probe mit definierter Aktivität zugegeben. Durch die Quantifizierung der Kontrollen konnte eine Freisetzung von Heparin während der Inkubation nahezu ausgeschlossen werden. Im Ergebnis konnten 85% der eingesetzten wt-XT-I-Aktivität im Überstand detektiert werden. Alle untersuchten Cystein-Mutanten konnten effizient an die Heparin-Matrix gebunden werden, so dass keine signifikant veränderten Bindungseigenschaften beobachtet wurden.

Um allerdings auch Cystein-Mutanten ohne Restaktivität auf ihre Bindung an Heparin untersuchen zu können, wurde die Methode des Western-Blots zur Visualisierung der gebundenen Enzymmenge verwendet. Die Zellkulturüberstände mit den jeweiligen Mutanten wurden mit Heparin-Beads inkubiert, zentrifugiert und durch Waschen mit PBS ungebundenes Enzym entfernt. Die Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und

der Überstand im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran konnte der Anteil an gebundenen Enzym visualisiert werden (Abb. 12). Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit der ursprünglich eingesetzten Enzymmenge auf das Gel aufgetragen.

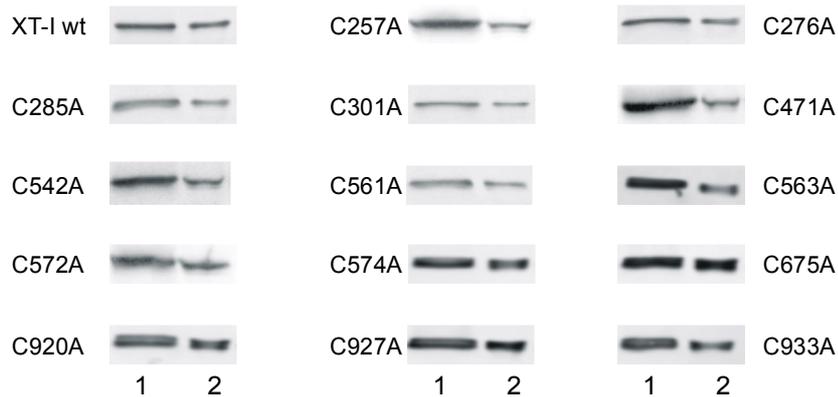


Abb. 12: Bindung von Cystein-Mutanten und wt-XT-I an Heparin-Beads.

In Spur 1 ist jeweils als Kontrolle eine Probe der Enzymmenge aufgetragen, die ursprünglich zu den Heparin-Beads zugegeben wurde. In Spur 2 ist der Anteil an Enzym zu erkennen, der sich von den Heparin-Beads durch Aufkochen abtrennen ließ.

Es wurde die überwiegende Enzymmenge an die Heparin-Beads gebunden und nicht durch die Waschschrte freigesetzt. Eine effiziente Bindung an Heparin konnte auch bei den nahezu inaktiven Mutanten gezeigt werden. Bei der Auswertung der Bindungseigenschaften an Heparin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Cystein-Mutanten und wt-XT-I festgestellt werden.

4.1.2.5.4. Inhibition mit UDP und Bindung an UDP-Beads

Für viele Glykosyltransferasen, einschließlich der humanen XT-I, ist UDP ein kompetitiver Inhibitor [90,91]. Die Bedeutung der Cystein-Reste für die Bindung des Nukleotid-Zuckers sollte durch die Inhibition der enzymatischen Aktivität der generierten Mutanten mit verschiedener UDP-Konzentrationen untersucht werden. Mutanten mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust wurden nicht berücksichtigt. Der Zusatz von 0,25 mM UDP inhibierte das Wildtyp-Enzym zu 98%, und die meisten Cystein-Mutanten konnten ebenso effizient durch den Zusatz von UDP inhibiert werden (Abb. 13). Bei der C561A Mutante ergab sich eine signifikant erhöhte relative Aktivität nach dem Zusatz von 0.25 mM UDP. Durch das Fehlen von Cys⁵⁶¹ kommt es eventuell zu einer Veränderung in der Nukleotid-Zucker bindenden Region, die zu einer schlechteren Bindung an UDP führen könnte.

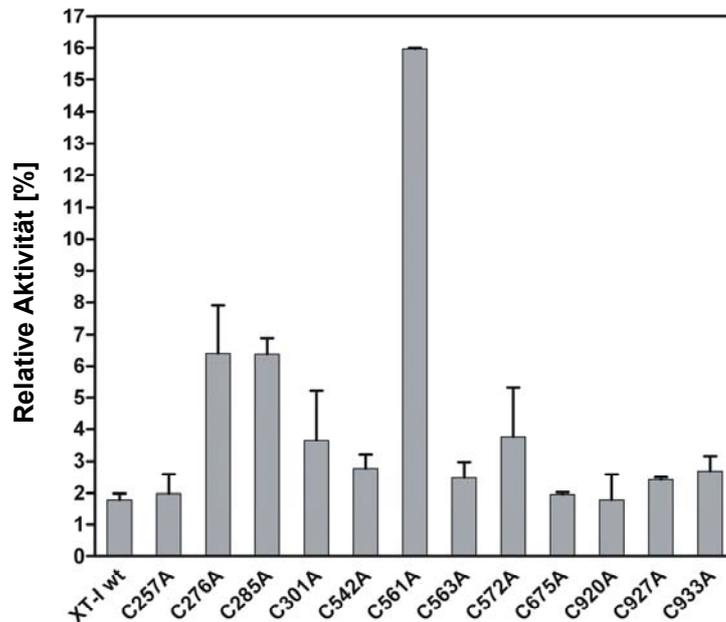


Abb. 13: Inhibition der Cystein-Mutanten und der wt-XT-I mit UDP.

wt-XT-I und Cystein-Mutanten wurden mit 0,25 mM UDP inkubiert und die Enzymaktivität im XT-Test bestimmt. Die relative Aktivität ist in % angegeben, wobei die Aktivität des jeweiligen Enzyms ohne Zusatz von Inhibitor als 100% definiert wurde. Die C561A Mutante zeigt eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Die Bindungscharakteristik der inaktiven Cys-Mutanten an UDP sollte in einem weiteren Versuch durch Western-Blot mit anschließender Immunofärbung analysiert werden. Dazu wurden Zellkulturüberstände mit rekombinantem Protein zusammen mit UDP-Agarose-Beads inkubiert, durch Waschen der Beads mit PBS ungebundenes Protein entfernt und der Anteil an gebundenen Protein im SDS-PAGE aufgetrennt. Die wt-XT-I bindet in der

Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen an die UDP-*Beads*, aber bei Zusatz von 25 mM UDP erfolgte keine erkennbare Bindung (Abb. 14). Der Überschuss an freiem UDP verhindert eine effiziente Bindung des Enzyms an die UDP-*Beads*. Keine Bindung des Wildtyp-Enzyms erfolgte in Gegenwart von 5 mM EDTA, daraus lässt sich die Bedeutung der Mn^{2+} -Ionen für eine erfolgreiche Bindung an UDP folgern.

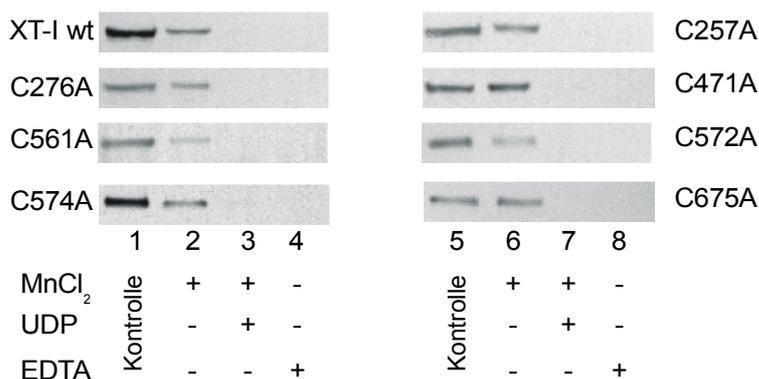


Abb. 14: Analyse der Bindungscharakteristik der Cystein-Mutanten mit geringer enzymatischer Aktivität für UDP.

UDP-Agarose-*Beads* wurden mit den Enzymproben inkubiert, zentrifugiert, gewaschen und die Probe in Puffer aufgekocht. Nach Elektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine durch Immunofärbung detektiert.

Ähnliche Ergebnisse wie für die wt-XT-I wurden für die eingesetzten Cystein-Mutanten erhalten. Es konnten keine signifikant veränderten Bindungseigenschaften der inaktiven Mutanten an UDP festgestellt werden.

4.1.2.5.5. Einfluss von Glykosaminoglykanen auf die enzymatische Aktivität der Cystein-Mutanten und der wt-XT-I

Die Inhibition der humanen XT-I durch Chondroitin-6-Sulfat und Heparan-Sulfat konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden [92]. Um den potentiell inhibitorischen Effekt der Glykosaminoglykane auf die Cystein-Mutanten-Enzyme zu untersuchen, wurden Enzymproben mit Chondroitin-6-Sulfat und Heparan-Sulfat inkubiert und anschließend die Aktivität quantifiziert. Die Analyse erfolgte in einem Bereich von 10 – 1000 µg/ml Effektor. Der Zusatz von 10 µg/ml Chondroitin-6-Sulfat inhibiert die Enzymaktivität der wt-XT-I zu 40% (Abb. 15), wogegen die Addition von 1000 µg/ml Chondroitin-6-Sulfat zu einem 80%igen Funktionsverlust führte. Bei den Cystein-Mutanten wurden sehr ähnliche

Ergebnisse erhalten, es konnte keine signifikante Änderung bei der Inhibition mit Chondroitin-6-Sulfat festgestellt werden.

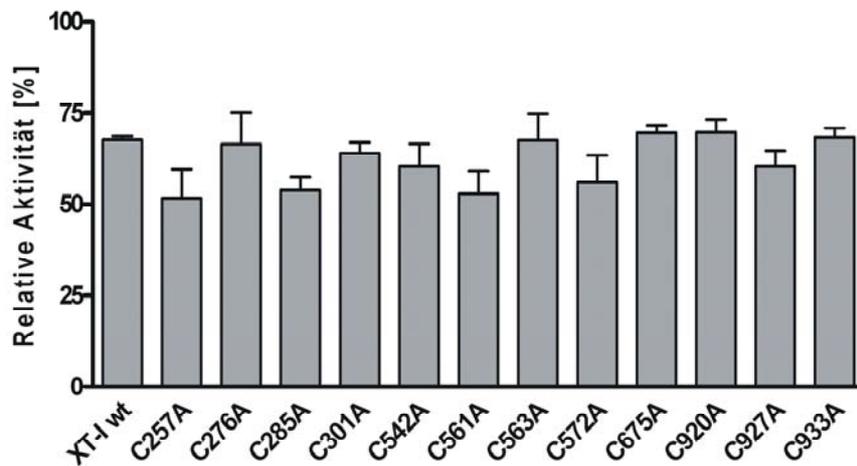


Abb. 15: Inhibition der enzymatischen Aktivität durch 10 µg/ml Chondroitin-6-Sulfat.

Durch die Zugabe von 1000 µg/ml Heparan-Sulfat lässt sich die enzymatische Aktivität der wt-XT-I zu 80% inhibieren, wobei die Cystein-Mutanten ähnliche Bindungseigenschaften zu Heparan-Sulfat aufweisen (Abb. 16).

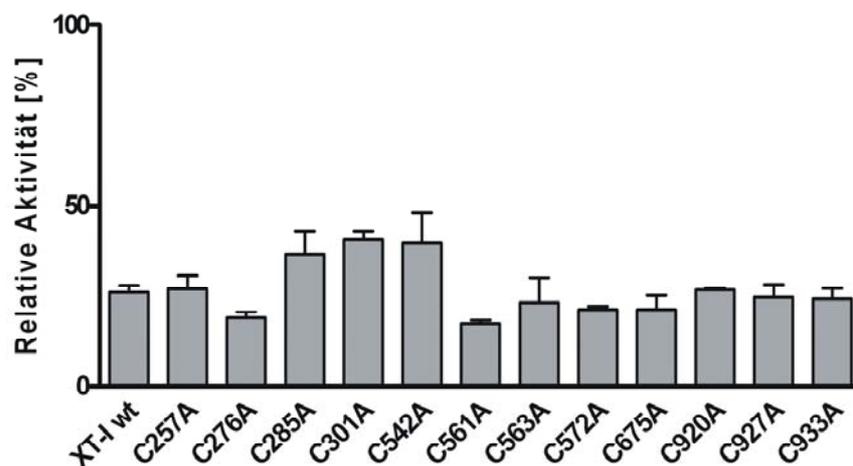


Abb. 16: Inhibition der enzymatischen Aktivität durch 1000 µg/ml Heparan Sulfat.

Die Inhibition der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten zeigt keine signifikanten Unterschiede.

4.1.3. Klonierung aminoterminaler XT-I-Mutanten und Expression in Insektenzellen

4.1.3.1. Alignment der N-terminalen XT-I-Sequenzen aus verschiedenen Spezies

Ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen der XT-I aus verschiedenen Spezies soll zur Identifizierung hoch homologer Bereiche durchgeführt werden, die von Bedeutung sein können zur Erhaltung einer funktionellen katalytischen Struktur des Enzyms. Verwendet werden die bekannten Sequenzen der XT-I von Mensch, Maus, Ratte und Kugelfisch. In der Abbildung 17 ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs dargestellt, an dem die hohe Homologie der XT-I gut erkennbar ist, die N-terminale Region weist jedoch sehr variable Bereiche auf. Teilweise besitzt der N-Terminus zusätzliche Reste, wie z.B. beim Menschen, oder es fehlen Aminosäuren, wie z.B. in dem Kugelfisch Enzym.

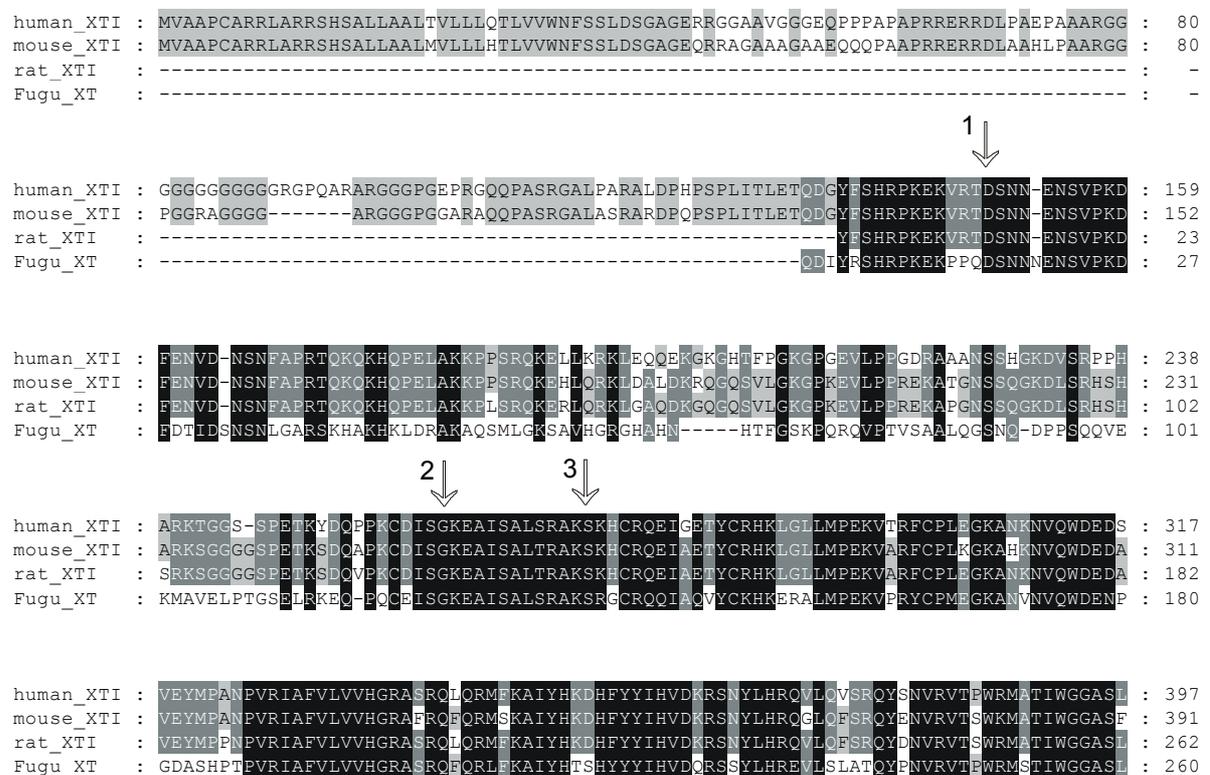


Abb. 17: Alignment der XT-I-Aminosäuresequenzen aus Mensch, Maus, Ratte und Kugelfisch.

Hoch-homologe Regionen sind hervorgehoben. Es ist nur der N-terminale Bereich bis zu Lys³⁹⁷ der humanen XT-I dargestellt. Die Pfeile markieren den Beginn der rekombinanten löslichen Form der XT-I (Pfeil 1), einer N-terminal verkürzten Mutante mit 100% Enzymaktivität (Pfeil 2) und einer N-terminal verkürzten Mutante mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust (Pfeil 3).

4.1.3.2. Klonierung von N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten

Die Bedeutung der N-terminalen Region der humanen XT-I für die enzymatische Aktivität soll durch die Klonierung von N-terminalen Deletionsmutanten und anschließender Expression der verkürzten Enzyme untersucht werden. Als Ausgangsvektor dient pCG255 Δ 1-148XT-I, der für eine lösliche Form der humanen XT-I mit hoher enzymatischer Aktivität kodiert. Es wurden insgesamt 9 verschiedene Mutanten generiert, deren Sequenz erst nach den folgenden Positionen beginnt: Lys¹⁸⁴, Pro²¹³, Ser²⁶⁰, Ser²⁶⁶, Lys²⁷², Ser²⁷³, Lys²⁷⁴, Leu²⁸⁹ und Ile⁵⁶⁸. Dazu wurden zunächst verschiedene Fragmente der XT-I mit Schnittstellenprimer amplifiziert und über die Restriktionsstellen der N-terminale Bereich im Expressionsvektor ausgetauscht (Abb. 18).

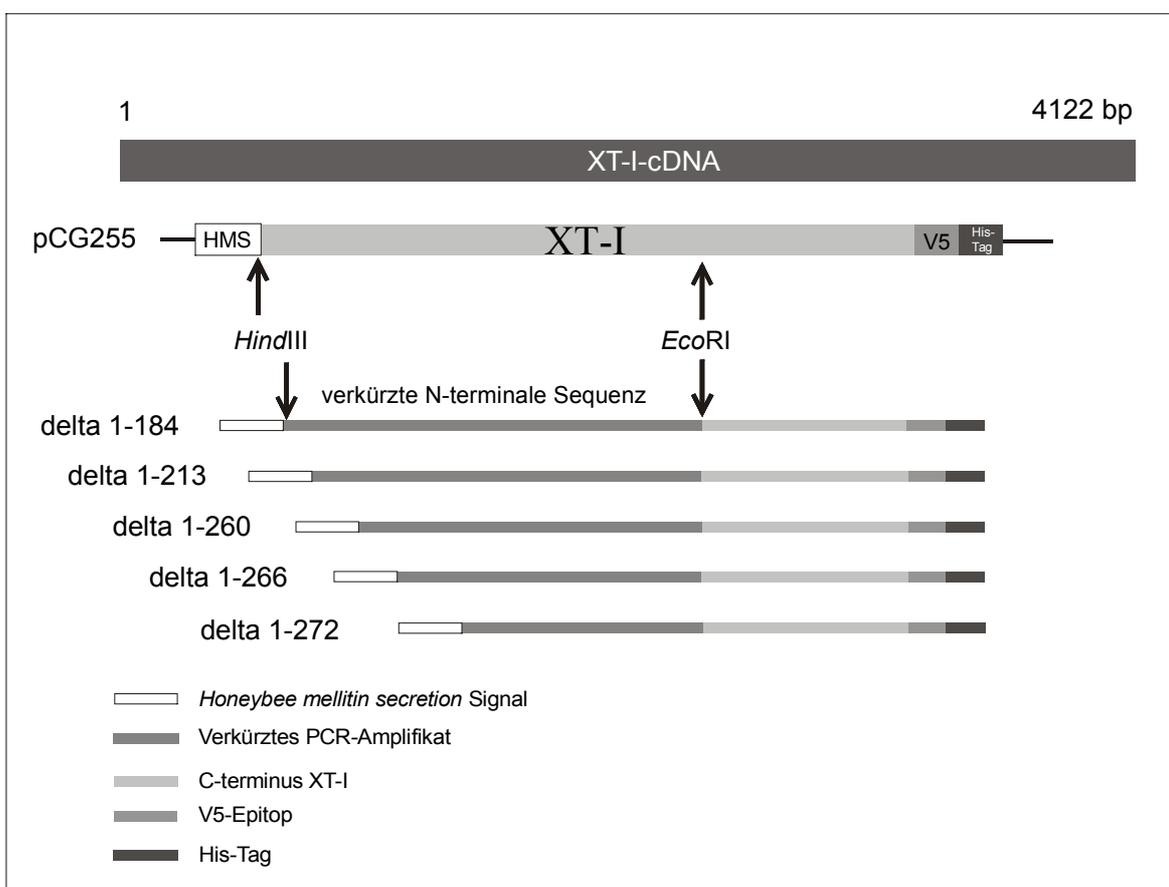


Abb. 18: Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung von N-terminal verkürzten Deletionsmutanten der humanen XT-I.

Als Ausgangsvektor für die Klonierung dient der Expressionsvektor pCG255, der für eine lösliche Form der humanen XT-I kodiert. Die Sekretion des Expressionsproduktes ermöglicht das *honeybee mellitin secretion* Signal, dessen Sequenz direkt vor dem Insert lokalisiert ist. Mittels PCR wird ein verkürztes Fragment amplifiziert, das über spezifische Schnittstellen verfügt. Durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließender Ligation werden die verkürzten Fragmente gegen die Original-Sequenz im Vektor pCG255 ausgetauscht.

Man erhält so eine Vielzahl von Expressionsvektoren, die alle die Sekretion des Genproduktes in den Zellkulturüberstand ermöglichen und eine Detektion und Aufreinigung über das V5-Epitop bzw. das His-Tag. Die klonierten Expressionsvektoren wurden wie folgt benannt: $[\Delta 1-184]$ XT-I, $[\Delta 1-213]$ XT-I, $[\Delta 1-260]$ XT-I, $[\Delta 1-266]$ XT-I, $[\Delta 1-272]$ XT-I, $[\Delta 1-273]$ XT-I, $[\Delta 1-274]$ XT-I, $[\Delta 1-289]$ XT-I und $[\Delta 1-568]$ XT-I, wobei die Nummerierung sich auf die deletierten Aminosäurereste bezieht. Die trunkierten Enzyme wurden in *High-Five*-Zellen exprimiert und die katalytischen Eigenschaften mit dem Wildtyp-Enzym verglichen.

4.1.3.3. Expression der N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten in Insektenzellen

Die Expression der N-terminalen Mutanten erfolgte in *High-Five*-Insektenzellen. Die Mutanten wurden in vergleichbarer Menge wie die wt-XT-I exprimiert und zunächst durch SDS-PAGE charakterisiert. Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und zeigten alle eine Einzelbande der jeweils erwarteten Größe (Abb. 19).

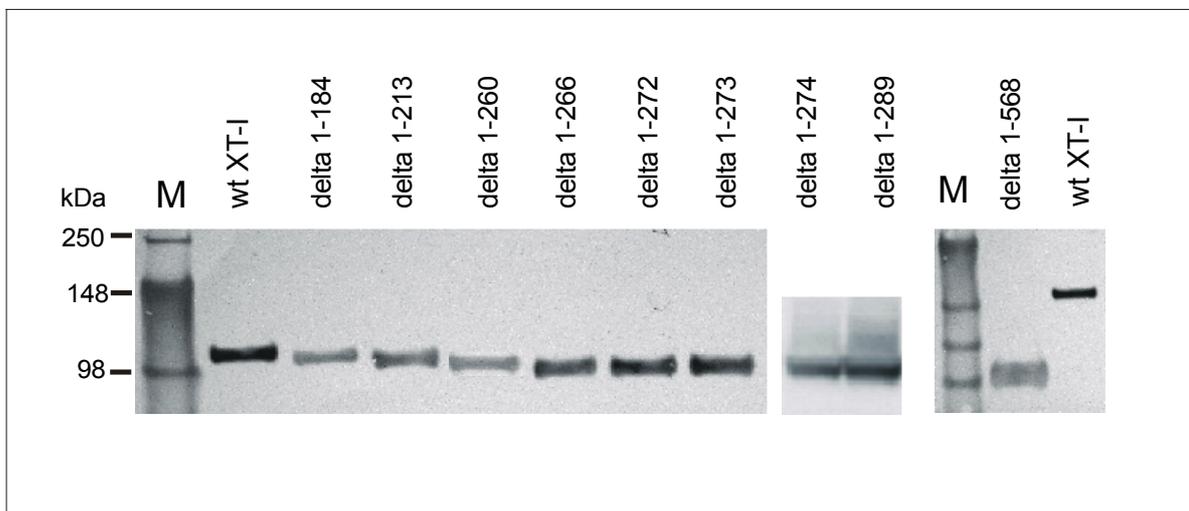


Abb. 19: Western-Blot zum Nachweis der Proteinexpression mit Anti-V5-Antikörpern.

Es wurde jeweils 50fach konzentrierter Zellkulturüberstand im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-V5-Antikörpern detektiert. Die Expression von insgesamt 9 verkürzten Varianten der XT-I konnte im Western-Blot nachgewiesen werden.

4.1.3.4. Analyse der katalytischen Aktivität der N-terminal verkürzten Mutanten

Zur Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität wurde der radiochemische Aktivitätstest mit den Mutanten-Enzymen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde in jedem Expressionsversuch die wt-XT-I in einem parallelen Ansatz exprimiert und quantifiziert.

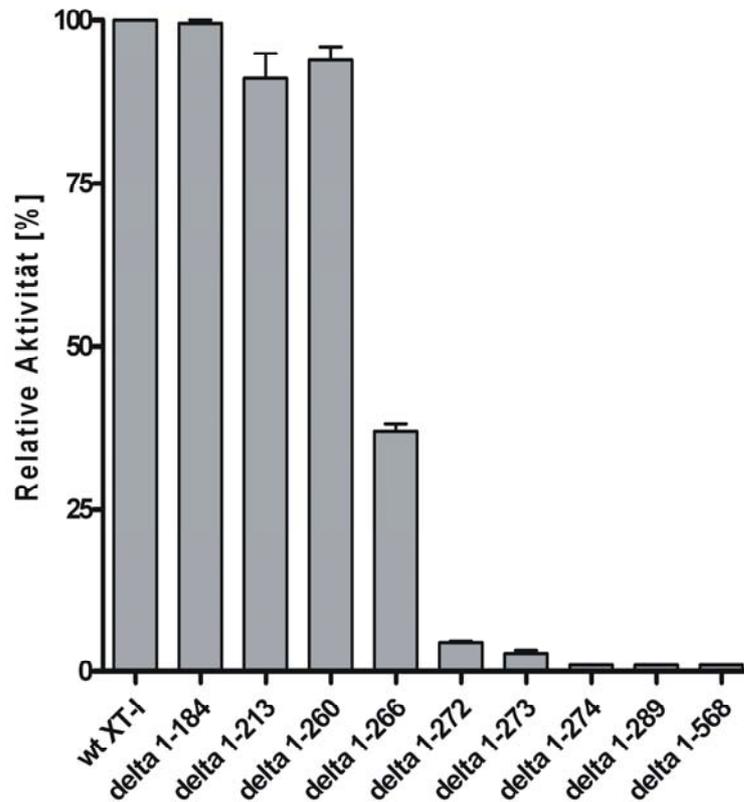


Abb. 20: XT-I-Aktivität der wt-XT-I und der N-terminal verkürzten Mutanten.

Die relative Aktivität des Wildtyp-Enzyms und der XT-I-Mutanten ist in Prozent dargestellt, wobei die Aktivität des Wildtyps als 100% definiert wurde.

Es konnten 5 verschiedene N-terminal verkürzte XT-I-Mutanten mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust detektiert werden (Abb.20). Diesen Mutanten fehlten 272 oder mehr der N-terminalen Aminosäuren. Eine delta 1-266XT-I Mutante zeigte einen Aktivitätsverlust von 70%, während eine delta 1-260XT-I Mutante über 100% Aktivität im Vergleich zum wt verfügt. Dieser gravierende Verlust an enzymatischer Aktivität durch die Deletion von nur 6 bzw. 12 Aminosäuren weist auf die Bedeutung dieser Sequenzregion zur Erhaltung einer funktionellen Aktivität der XT-I hin. Alle Mutanten, denen 260 Aminosäuren fehlen oder weniger, besitzen die volle katalytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

4.1.3.5. Charakterisierung der aminoterminalen XT-I-Mutanten

4.1.3.5.1. Einfluß von DTT auf die enzymatische Aktivität der Mutanten

Die Enzymaktivität der wt-XT-I und der N-terminalen Mutanten sollte unter reduzierenden Bedingungen untersucht werden. Dafür wurden die Enzyme mit steigenden DTT Konzentrationen inkubiert und anschließend die verbleibende Aktivität quantifiziert. Die bereits enzymatisch inaktiven Mutanten konnte nicht durch die Zugabe von DTT aktiviert werden. Die Addition von 0,62 mM DTT inhibierte die $[\Delta 1-184]$ XT-I Mutante zu 80%, vergleichbar der wt-XT-I. $[\Delta 1-213]$ XT-I, $[\Delta 1-260]$ XT-I und $[\Delta 1-266]$ XT-I zeigten nach Inkubation in 0,62 mM DTT eine stärkere Inhibition der enzymatischen Aktivität (Abb. 21).

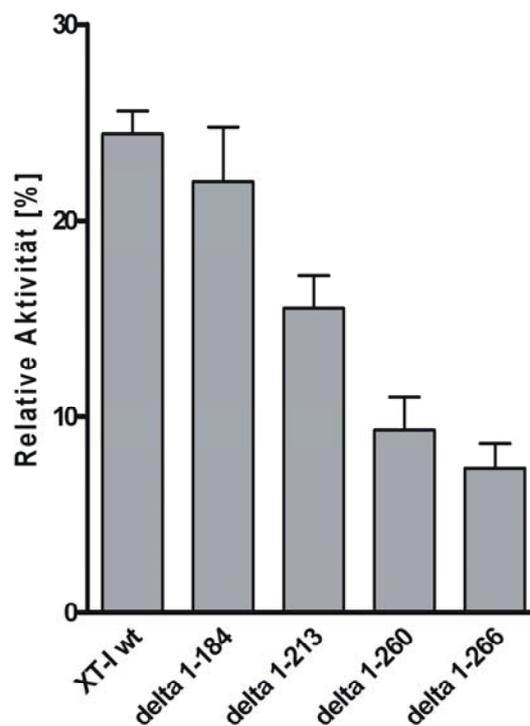


Abb. 21: Der inhibitorische Effekt von 0,62 mM DTT auf die wt-XT-I und die aminoterminal verkürzten Mutanten delta1-184, delta 1-213, delta 1-260 und delta 1-266 ist dargestellt. Auffällig ist die unterschiedliche Sensitivität der Mutanten für geringe DTT Konzentrationen.

Durch den Zusatz von 2,5 mM DTT konnte die enzymatische Aktivität der wt-XT-I sowie der N-terminalen Mutanten nahezu vollständig inhibiert werden, dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Enzymen erkannt werden.

4.1.3.5.2. Inhibition der N-terminalen XT-I-Mutanten durch Heparin

Aufgrund der hohen Affinität der humanen XT-I zu Heparin sollten die enzymatisch aktiven, aminoterminalen Mutanten auf ihre Inhibierung durch Heparin untersucht werden. Alle analysierten Mutanten konnten durch den Zusatz von 1-100 IU/ml Heparin effektiv inhibiert werden. Die Addition von 1 IU/ml Heparin führte zu einer 95%igen Reduktion der enzymatischen Aktivität sowohl beim Wildtyp wie bei den Mutanten. Die Bindung an Heparin erscheint bei den katalytisch aktiven Mutanten, denen maximal 266 Aminosäuren fehlen, nicht beeinflusst zu sein. Mit dieser Methode lassen sich jedoch die inaktiven Mutanten nicht auf ihre Bindungseigenschaften untersuchen.

Im weiteren wurde die Bindung der N-terminal verkürzten Mutanten an immobilisiertes Heparin untersucht. Zellkulturüberstand mit der jeweilig exprimierten Mutante wurde zusammen mit Heparin-*Beads* für 1 h inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend der Anteil an gebundenen Enzym durch Western-Blot detektiert. Alle untersuchten Enzym-Mutanten konnten effizient an die Heparin-*Beads* gebunden werden, wobei anscheinend eine leicht schwächere Bindung bei den kürzesten Mutanten, $[\Delta 1-289]$ XT-I und $[\Delta 1-568]$ XT-I, zu erkennen war (Abb. 22).

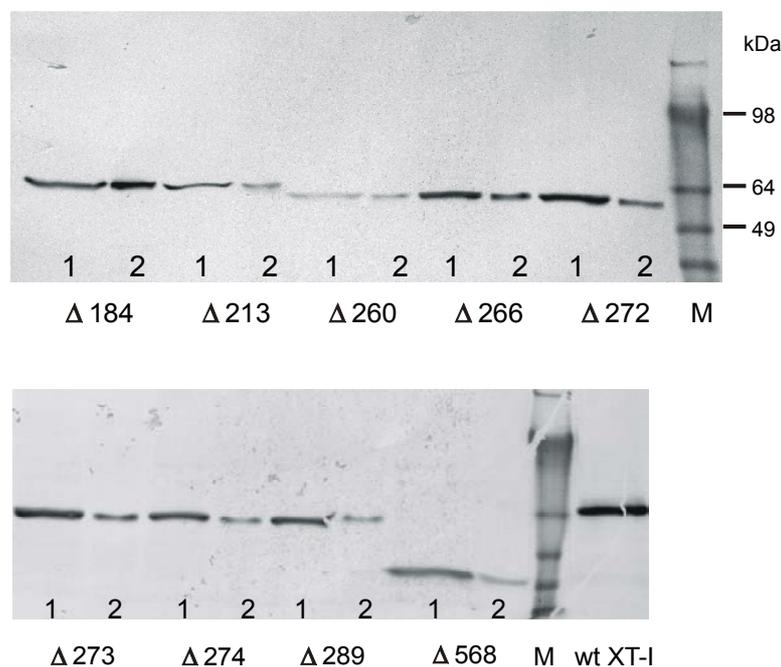


Abb. 22: Bindung der N-terminalen XT-I-Mutanten an Heparin-*Beads*.

Eine definierte Enzymmenge wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit Heparin-*Beads* inkubiert, abzentrifugiert, gewaschen und der Anteil an gebundenem Enzym durch Western-Blot detektiert. In Spur 1 ist jeweils die Enzymmenge aufgetragen, die ursprünglich zu den *Beads* zugefügt wurde. Spur 2 zeigt den Anteil an Enzym, der an die Heparin-Matrix gebunden wurde.

4.1.3.5.3. Inhibition der XT-I-Mutanten mit UDP

Da die inhibierende Eigenschaft von UDP auf die humane XT-I bekannt ist, sollten auch die N-terminal verkürzten Enzyme auf eine potentielle UDP-Bindungsregion hin untersucht werden. Die generierten XT-I-Mutanten wurden mit verschiedenen UDP Konzentrationen inkubiert und ihre Aktivität quantifiziert. Die Inkubation in 0,25 mM UDP inhibierte die Enzymaktivität der wt-XT-I sowie der Mutanten zu 98%, dabei konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Mutanten, denen maximal bis zu 266 Aminosäuren fehlen, besitzen anscheinend eine intakte Bindungsstelle für UDP.

4.1.3.5.4. Einfluss von Heparan-Sulfat auf die Aktivität der aminoterminalen Mutanten

Der Einfluss von Heparan-Sulfat auf die Aktivität der humanen XT-I wurde bereits in früheren Studien gezeigt. Eine Analyse der N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten zeigte keine veränderten Eigenschaften, auch hier wurden hohe Konzentrationen von Heparan-Sulfat (1000 µg/ml) benötigt, um eine Inhibierung von 80% zu erreichen. Niedrigere Konzentrationen zeigten kaum einen Effekt auf die enzymatische Aktivität. Alle getesteten Mutanten zeigten eine ähnliche Sensitivität für das Reagent wie die wt-XT-I.

4.1.4. Klonierung carboxyterminaler XT-I-Mutanten und Expression in Insektenzellen

Neben den aminoterminalen XT-I-Mutanten sollten mit einer ähnlichen Strategie auch carboxyterminale Mutanten kloniert und in *High-Five*-Zellen exprimiert werden. Grundlage für die Klonierung war der Basisvektor pCG255Δ1-148, der die lösliche Form der humanen XT-I ohne Transmembrandomäne kodiert. Durch PCR amplifizierte Fragmente der C-terminalen Sequenz der XT-I sollten über Restriktionsschnittstellen ausgetauscht werden und so die Sequenz am 5'-Ende verkürzt werden. Durch Analyse der Enzymaktivität sollte die minimale, katalytisch aktive Domäne der XT-I bestimmt werden.

Es wurden insgesamt 21 verschiedene C-terminale Deletionsmutanten der humanen XT-I kloniert und durch Sequenzierung der korrekte Leserahmens bestätigt. Diese Expressionsvektoren wurden für transiente Transfektionen in Insektenzellen eingesetzt, wobei als Positiv-Kontrolle in einem parallelen Ansatz der Vektor mit der wt-XT-I transfiziert wurde. Bei keinem Expressionsversuch konnte ein exprimiertes Protein

nachgewiesen werden, obwohl die jeweilige Kontrolle mit dem wt-XT-I Enzym positiv war. Die C-terminale Deletion der XT-I-Sequenz in dem Vektor pCG255 hatte zur Folge, dass keine Proteinexpression mehr nachweisbar war.

4.1.5. Enzymkinetik der XT-I-Varianten

4.1.5.1. Bestimmung der K_M und v_{max} Werte der wt-XT-I und der XT-I-Mutanten

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten XT-I und der verschiedenen XT-I-Mutanten wurden bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in einem Bereich von 0,0625 bis 6 μM Bikunin und konstanter Enzymmenge untersucht. Für die humane XT-I wurde die Michaelis-Menten-Kinetik angenommen. Mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und die Michaelis-Konstanten (K_M) des Wildtyp-Enzyms und der Mutanten bestimmt.

Der K_M -Wert für die rekombinante humane XT-I beträgt 0,8 μM [78]. Der experimentell bestimmte K_M -Wert liegt in guter Näherung zum Literaturwert bei 1,0 μM . Die Michaelis-Konstanten der Cystein-Mutanten zeigen fast alle keine signifikante Änderung zum Wildtyp (Tab. 1). Bei den Mutanten C257A und C563A wurden mit $K_M = 5.3 \mu\text{M}$ bzw. $K_M = 11.9 \mu\text{M}$ deutlich erhöhte Michaelis-Konstanten bestimmt, was auf eine Veränderung in den Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat deuten kann.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die wt-XT-I wurde mit 882 pmol/h ermittelt, wobei beim Vergleich mit den Cystein-Mutanten sowohl steigende als auch fallende Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Den höchsten Wert für v_{max} zeigte die C675A Mutante mit 1900 pmol/h, die niedrigsten Werte wurden mit ca. 500 pmol/h für die C257A und die C542A Mutante bestimmt.

Mutante	K_M	v_{max}	v_{max}/K_M
	<i>μM</i>	<i>pmol h⁻¹</i>	<i>pmol h⁻¹ μM⁻¹</i>
wt XT-I	1.0	882	900
p.C257A	5.3	514	398
p.C276A	--	--	--
p.C285A	2.8	938	488
p.C301A	1.4	693	396
p.C471A	--	--	--
p.C542A	1.6	509	310
p.C561A	--	--	--
p.C563A	11.9	1400	436
p.C572A	--	--	--
p.C574A	--	--	--
p.C675A	1.4	1900	1357
p.C920A	1.2	1600	1333
p.C927A	2.0	1300	650
p.C933A	1.0	1168	1229

Tab. 1: K_M und v_{max} Werte der wt-XT-I und der Cystein-Mutanten.

Übersicht über die K_M-Werte für Bikunin von wt-XT-I und Cystein-Mutanten ermittelt bei heterologer Expression. Bei Mutanten mit sehr geringer Aktivität war K_M nicht bestimmbar (--).

Bei den aminoterminalen XT-I-Mutanten weisen die K_M-Werte einen Anstieg von 0.9 bis 5.4 μM auf, wobei der höchste Wert bei der Δ1-272XT-I-Mutante bestimmt wurde (Tab.2). Gleichzeitig zeigen die Mutanten mit dem zunehmenden Verlust an Aminosäuren einen kontinuierlichen Abfall der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit auf. Die Werte für v_{max}/K_M, die ein Maß für die Affinität des Akzeptors darstellen, fallen insgesamt um den Faktor 10 ab.

Mutante	K_M	v_{max}	v_{max}/K_M
	<i>μM</i>	<i>pmol h⁻¹</i>	<i>pmol h⁻¹ μM⁻¹</i>
Δ1-184XT-I	0.9	990	1100
Δ1-213XT-I	1.4	930	664
Δ1-260XT-I	1.4	840	600
Δ1-266XT-I	5.0	540	108
Δ1-272XT-I	5.4	640	118
Δ1-273XT-I	--	--	-
Δ1-274XT-I	--	--	-
Δ1-289XT-I	--	--	-
Δ1-568XT-I	--	--	-

Tab. 2: K_M und v_{max} Werte der wt-XT-I und der aminoterminalen Mutanten.

4.1.6. Bestimmung der potentiellen Heparin-Bindungsstelle von wt-XT-I

4.1.6.1. Western-Blot-Analyse der Bindung von wt-XT-I an Heparin unter Destruktion der dreidimensionalen Struktur

Die Analyse der strukturellen Eigenschaften von vielen bekannten heparinbindenden Proteinen hat die Präsenz von konservierten Motiven aufgezeigt, durch welche die Heparinbindung vermittelt wird. Oft handelt es sich dabei um Lys- oder Arg-reiche Sequenzen, die durch ihre basischen Eigenschaften eine Bindung an das polyanionische Heparin ermöglichen. Da die humane XT-I mit hoher Affinität an Heparin bindet, sollte die Bindungsregion lokalisiert werden und weiterhin untersucht werden, ob diese in der dreidimensionalen Struktur oder der Primärsequenz des Enzyms begründet ist.

Dazu wurde die wt-XT-I unter reduzierenden Bedingungen mit Heparin-*Beads* inkubiert. Es wurde 2,5 mM DTT eingesetzt, da in diesem Bereich die wt-XT-I als nahezu vollständig inaktives Enzym vorliegt und daher die dreidimensionale Struktur vollständig

zerstört sein sollte. Zusätzlich wurde eine Enzymprobe analysiert, die zunächst für 5 min bei 80°C denaturiert wurde, bevor diese zu Heparin-*Beads* gegeben wurde. Beide Proben wurden für 1 h mit den *Beads* inkubiert, zentrifugiert und durch Waschen ungebundenes Protein entfernt. Der Anteil an Enzym, der an die Heparin-*Beads* gebunden wurde, konnte durch Western-Blot-Analyse visualisiert werden (Abb. 23).

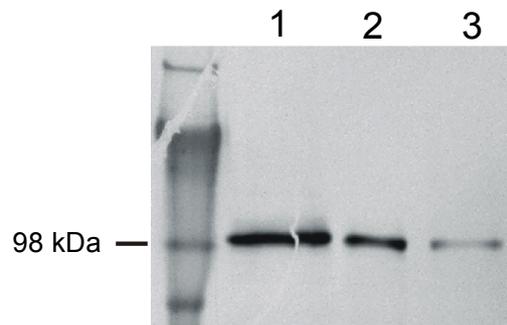


Abb. 23: Western-Blot zur Analyse der Bindung der wt-XT-I an immobilisiertem Heparin unter nativen und denaturierenden Bedingungen.

Die dreidimensionale Struktur der wt-XT-I wurde durch den Zusatz von 2,5 mM DTT bzw. durch Hitzedenaturierung zerstört und anschließend das Enzym mit Heparin-*Beads* inkubiert. Der an die *Beads* gebundene Anteil an Enzym wurde durch Western-Blot Analyse mit Immunofärbung sichtbar gemacht. Spur 1: Probe der unbehandelten Enzymmenge, die zu den *Beads* zugegeben wurde. Spur 2: 2,5 mM DTT behandelte Probe. Spur 3: Hitzedenaturierte Probe.

Die durch den Zusatz von DTT denaturierte Enzymprobe konnte effizient an die Heparin-Matrix gebunden werden. Auch das hitzedenaturierte Enzym zeigte noch eine gute Bindung an die Heparin-*Beads*, obwohl bei diesem Versuch große Proteinmengen bereits bei der Denaturierung ausgefällt wurden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die dreidimensionale Struktur keinen Einfluss auf die effiziente Bindung der humanen XT-I an Heparin besitzt.

4.1.6.2. Analyse der Primärsequenz der wt-XT-I nach potentiellen Bindungsmotiven

Cardin und Weintraub haben zwei basische Aminosäure-Cluster identifiziert, in denen die Aminosäuren nach dem Muster *XBBXB* oder *XBBBXXB* vorliegen, wobei *B* = eine basische Aminosäure, meist Arginin oder Lysin, und *X* = eine ungeladene oder hydrophobe Aminosäure repräsentieren [80].

Die Aminosäuresequenz der humanen XT-I wurde auf entsprechende basische Cluster analysiert. Die Primärsequenz der XT-I besitzt keinen exakt der beschriebenen Sequenzen entsprechenden Abschnitt, jedoch konnte eine sehr ähnliche Sequenz mit dem Muster *XBBXXBX* in der Position Pro⁷²¹ bis Ile⁷²⁷ ermittelt werden, die in allen exprimierten, verkürzten Mutanten noch erhalten war (Abb. 24). Zusätzlich sind bei der Analyse der Aminosäuresequenz eine Vielzahl von kurzen basischen Clustern aufgefallen, die über die gesamte Sequenz verstreut liegen. Die hohe Affinität der humanen XT-I zu Heparin kann nicht unbedingt nur auf einem Sequenzmotiv beruhen, sondern durch mehrere kurze Sequenzmotive vermittelt wird.

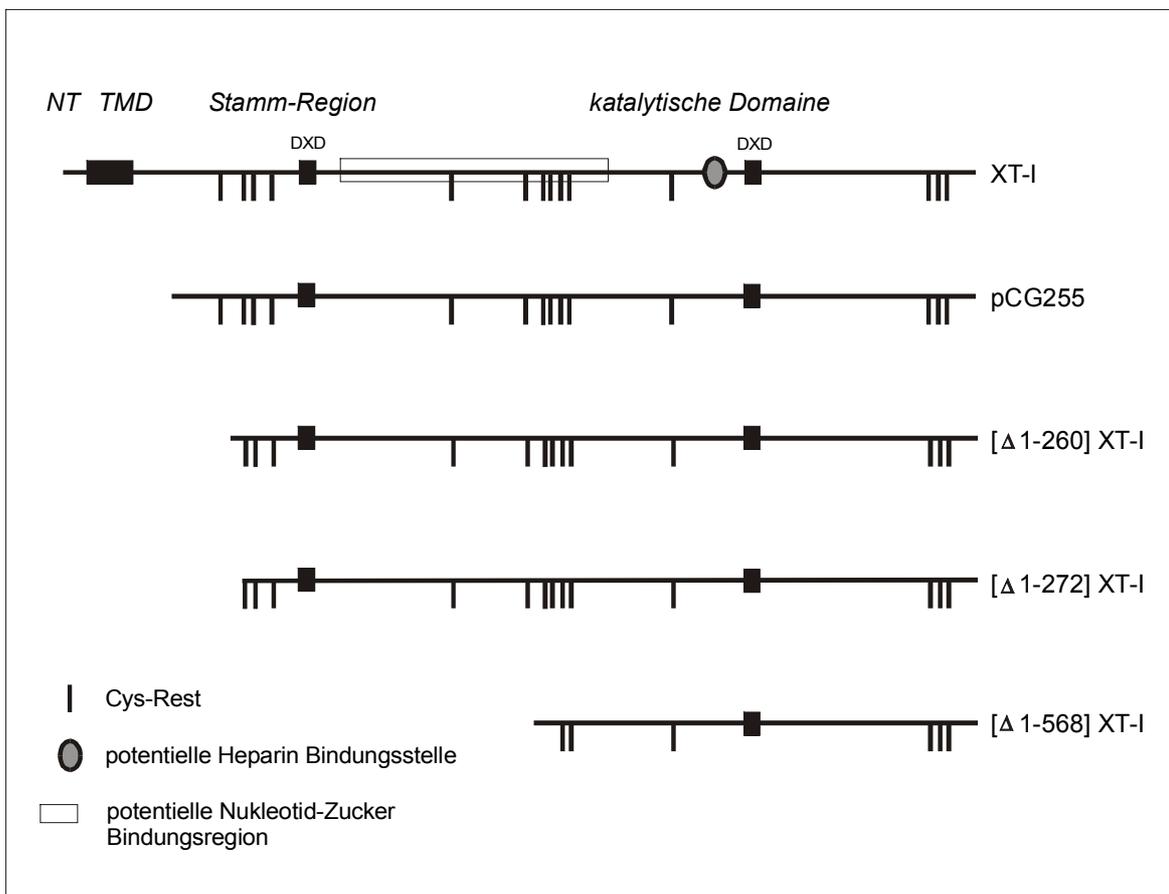


Abb. 24: Schematische Darstellung der postulierten XT-I-Topologie.

XT-I zählt zu den Typ-II-Transmembranproteinen und besitzt deren typische Struktur mit einer cytosolischen N-terminalen Region (*NT*), eine Transmembrandomäne (*TMD*), eine Stamm-Region und eine große katalytische Domäne. Die Positionen der konservierten Cystein-Reste, der 2 DxD-Motive, der potentiellen Bindungsregion für den Nukleotid-Zucker und die Sequenzregion der potentiellen Heparin-Bindung sind markiert.

Ergänzend ist die Struktur von pCG255-XT-I und den beiden aminoterminalen Mutanten [Δ1-260]XT-I und [Δ1-272]XT-I dargestellt. Der Verlust von 12 Aminosäuren führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Bei der [Δ1-568]XT-I Mutante handelt es sich um das kürzeste Fragment, das von der XT-I exprimiert werden konnte. Auch diese stark verkürzte Mutante konnte effizient an Heparin gebunden werden.

4.1.7. N-Glykosylierungsmutanten

4.1.7.1. Gerichtete Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen der XT-I

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei der humanen XT-I um ein Glykoprotein handelt, das einen N-glykosydisch gebundenen Kohlenhydratanteil von ca. 3% besitzt [79]. Die humane XT-I besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die Asparagin-Reste N226, N421 und N777 der wt-XT-I wurden zunächst einzeln in Glutaminreste umgeändert. Es wurde Glutamin gewählt, da es Asparagin strukturell und chemisch sehr ähnlich ist, so dass aufgrund der Mutagenese keine Veränderungen in Struktur und Eigenschaft des Proteins auftreten sollten. Grundlage der Konstrukte war jeweils der Vektor pCG255 Δ 1-148XT-I. Es konnten Expressionsvektoren für Einfachmutanten der Kombination N226Q und Doppelmutanten der Kombination N226Q/N777Q hergestellt und durch Sequenzierung bestätigt werden.

4.1.7.2. Nachweis der Expression der N-Glykosylierungsmutanten und Bestimmung der relativen Aktivität

Der Nachweis einer erfolgreichen Expression erfolgte zunächst im Western-Blot mit anschließender Immunofärbung mit Anti-V5-Antikörpern. Die wt-XT-I und die Mutante N226Q/N777Q wurden mit ähnlicher Enzymmenge exprimiert, wobei die Mutante ein geringfügig geringeres Molekulargewicht zeigt (Abb. 25). Das Fehlen von 2 Glykosylierungsstellen der XT-I führt auch bei der Expression in Insektenzellen zu Proteinen mit geringerem Kohlehydratanteil.

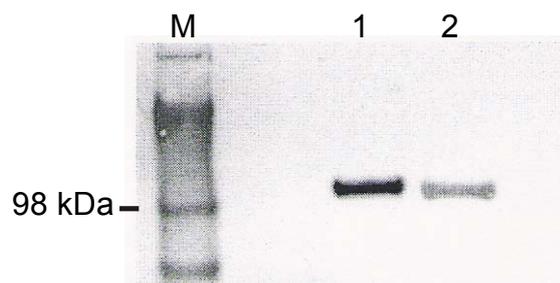


Abb. 25: Western-Blot-Analyse der N-Glykosylierungsmutante der Kombination N226Q/N777Q.

Die Expression der wt-XT-I und der Doppelmutante N226Q/N777Q erfolgte in *High-Five*-Zellen in parallelen Ansätzen. Der Zellkulturüberstand wurde 50fach konzentriert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 1 zeigt die wt-XT-I bei einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Die Doppelmutante N226Q/N777Q ist in Spur 2 zu erkennen.

In einer weiteren Analyse sollte geklärt werden, ob sich der fehlende Kohlehydratanteil auf die Aktivität der Enzyme auswirkt. Zur Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität wurde

der radiochemische Aktivitätstest mit den Mutanten-Enzymen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wird in jedem Expressionsversuch die wt-XT-I in einem parallelen Ansatz exprimiert und quantifiziert. Für die Analyse der Aktivität wurden Mutanten der Kombination N226Q und N226Q/N777Q eingesetzt. Bei den untersuchten Mutanten konnte keine signifikante Änderung in der enzymatischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym festgestellt werden. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass die fehlenden Glykosylierungen keinen Einfluss auf die Aktivität besitzen.

4.1.8. Klonierung der humanen XT-II

Für die Expression der humanen XT-II war noch kein Expressionssystem etabliert, so dass zunächst zwei Strategien für die Klonierung von Expressionsvektoren verfolgt wurden.

Der Vektor pMIB/V5-His-A ermöglicht durch die vektorkodierte *Melittin*-Signalsequenz eine Sekretion des Expressionsproduktes in den Zellkulturüberstand. Die vollständige Sequenz der XT-II kodiert für ein Transmembranprotein, daher mussten bei diesem Vektor die Primer so gewählt werden, dass ein Fragment generiert wird, welches für eine lösliche Form der XT-II ohne N-terminale Transmembrandomäne kodiert.

Parallel wurde eine zweite Strategie für die Expression mit dem Vektor pIB/V5-His-A verfolgt. Dieser Vektor ermöglichte die Insertion der vollständigen XT-II-cDNA, da dieser keine Signalsequenz besitzt.

Die Klonierung erfolgte in folgenden Schritten:

- Amplifikation von XT-II-spezifischer cDNA aus dem IMAGE Klon 6380013.
- Klonierung der amplifizierten PCR-Produkte in die Expressionsvektoren pMIB/V5-His-A bzw. pIB/V5-His-A.
- Sequenzierung der XT-II-cDNA zur Überprüfung des korrekten Leserahmens.

4.1.8.1. Klonierung der humanen XT-II in den Vektor pIB/V5-His-A

Die vollständige cDNA der XT-II besitzt eine Länge von 3608 bp mit einem 3'-untranslatierten Bereich von 850 bp und einem 5'-untranslatierten Region von 150 bp. Die XT-II-cDNA wird aus dem IMAGE Klon 6380013 amplifiziert, wobei die Primer so gewählt werden, dass ein 2497 bp langes DNA-Fragment generiert wird, welches für die nahezu vollständige XT-II kodiert. Über *HindIII* und *XbaI* Restriktionsstellen wurden die XT-II-Fragmente in den pIB/V5 Vektor ligiert und durch Sequenzierung der korrekte

Leserahmen bestätigt. Die Expressionsversuche in Insektenzellen mit den so erhaltenen Vektoren verliefen alle negativ, da kein Expressionsprodukt nachgewiesen werden konnte. Die Expression des vollständigen Transmembranproteins war weder im Zellpellet von transfizierten Insektenzellen noch im Zelllysate nachweisbar.

4.1.8.2. Klonierung der humanen XT-II in den Vektor pMIB/V5-His-A

Als Expressionsvektor wurde der Vektor pMIB/V5-His-A ausgewählt, da dieser den Vorteil einer maximierten Proteinexpression in Insektenzellen besitzt. Die Primer für die Amplifikation der XT-II-cDNA wurden so gewählt, dass ein Fragment generiert wird, welches für eine lösliche Form der XT-II kodiert. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* gespalten, mittels *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und mit dem entsprechend restringierten Expressionsvektor pMIB/V5-His-A ligiert. Bei Expression entsteht ein Fusionsprotein mit dem N-terminal lokalisierten *Honeybee melittin secretion signal* und den beiden C-terminal lokalisierten V5- und 6xHis-Epitopen.

Folgende Vektoren wurden erfolgreich kloniert, durch Sequenzierung der korrekte Leserahmen überprüft und für die Transfektion von Insektenzellen eingesetzt:

Basis-Vektor	XT-II-cDNA [bp]	Name des Expressionsvektors
pMIBV5/His-A	2396	pSM72-3
pMIBV5/His-A	2316	pSM73-2
pMIBV5/His-A	2291	pSM74-1
pMIBV5/His-A	2180	pSM85-13
pMIBV5/His-A	2111	pSM86-1
pMIBV5/His-A	2057	pSM87-7
pMIBV5/His-A	1970	pSM88-7
pMIBV5/His-A	2444	pSM117-5

Tab. 3: Darstellung der für die Transfektion eingesetzten Vektoren mit entsprechender Insertgröße.

Expressionsprodukte werden als Fusionsprotein mit den V5- und His-Epitopen sezerniert.

4.1.8.3. Expression der humanen XT-II in *High-Five*-Insektenzellen

4.1.8.3.1. Transiente Expression durch Liposomen-vermittelte Transfektion

Zur rekombinanten Darstellung der humanen XT-II wurden *High-Five*-Zellen mit Plasmid-DNA der klonierten Vektoren transient transfiziert. Für die Transfektion wurden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen überführt und bei einer 50%-igen Konfluenz mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen bei 27°C wurde zur Analyse der Proteinexpression der Zellkulturüberstand durch Ultrazentrifugation 50fach aufkonzentriert. Als Positiv-Kontrolle wurde der Vektor pCG255XT-I in parallelen Ansätzen eingesetzt. Es konnte keine Proteinexpression der humanen XT-II nachgewiesen werden.

4.1.8.3.2. Darstellung von rekombinanter XT-II in *E.coli*

Da bisher keine der verfolgten Strategien zu einer erfolgreichen Expression von XT-II geführt haben, sollte eine Kontrollexpression von XT-I und XT-II in *E.coli* durchgeführt werden. Dazu wurden Klone des Bakterienstammes BL21 (DE3), die jeweils die codierende DNA-Sequenz für eines der beiden Proteine in einem pET102 Expressionsvektor trugen, eingesetzt. Die Proteinexpression kann bei diesem System durch den Zusatz von 1 M IPTG induziert werden, wobei eine anschließende Analyse der Bakterienkultur durch SDS-PAGE erfolgte (Abb. 26).

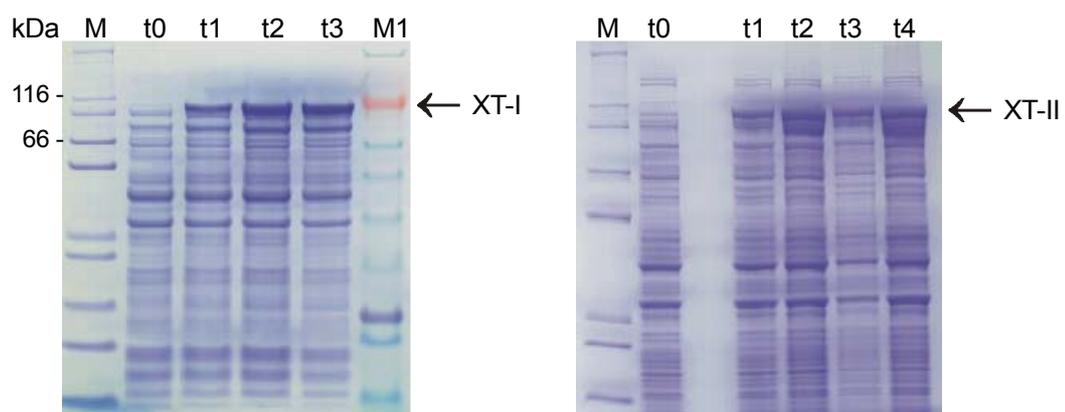


Abb. 26: SDS-PAGE von XT-I- und XT-II-Expressionen in *E.coli*.

In Spur M wurde *Mark12 Wide Range Protein*-Standard aufgetragen, in Spur M1 *See Blue Plus2 Pre-Stained* Standard. Spur t0 zeigt die Proteine der nicht induzierten Kultur. Die Spuren t1 bis t4 zeigen die Proteinexpression nach 1 bis 4 h nach Induktion an. Beide Proteine konnten in *E.coli* erfolgreich exprimiert werden, lagen jedoch in inaktiver Form vor.

4.1.8.4. Generierung eines stabilen XT-II-Klons in *High-Five*-Zellen

Werden *High-Five*-Zellen in Blasticidin-haltigem Medium kultiviert, führt dies innerhalb weniger Tage zu einem Absterben der Zellen. Der Vektor pMIB/V5-His-A vermittelt eine Resistenz gegen Blasticidin und ermöglicht somit die Selektion stabiler Klone.

Für die Selektion stabiler Klone wurden transfizierte *High-Five*-Zellen nach 2tägiger Inkubation in Selektionsmedium mit 80 µg/ml Blasticidin kultiviert. Nach 5tägiger Inkubation im Selektionsmedium konnte ein überwiegendes Absterben der Zellen beobachtet werden. Die abgestorbenen Zellen wurden durch Mediumwechsel abgetrennt und die Kultivierung mit Selektionsmedium für 4 Wochen fortgesetzt. Für die Analyse der Proteinexpression wird der Zellkulturüberstand 50fach konzentriert.

4.1.8.5. Immunologischer Nachweis der XT-II-Expression

Von den aufkonzentrierten Zellkulturüberständen wurden jeweils 15 µl in einem 4-12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *Electroblotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Die immunologische Detektion erfolgte mit dem alkalische Phosphatasegekoppelten Anti-V5-AP-Antikörper (Verdünnung 1:1000), wobei eine Proteinexpression der humanen XT-II nachgewiesen werden konnte (Abb. 27).

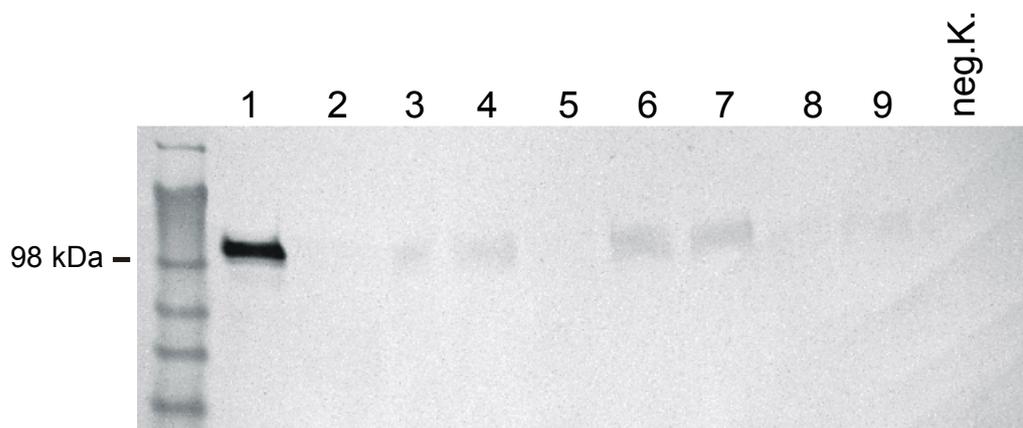


Abb. 27: Western-Blot zur Detektion des XT-II-V5-Fusionsproteins mit dem Anti-V5-AP-Antikörper.

Zellkulturüberstand eines polyklonalen, stabilen XT-II-*High-Five*-Klons wurde nach 4-8 Wochen Kultivierung 50fach aufkonzentriert und vor der Immunodetektion elektrophoretisch aufgetrennt. Marker: *See Blue Plus2 Pre Stained Protein Standard*; Spur 1: pos. Kontrolle pCG255-XT-I (100 kDa), Spur 2-8: pSM72-3-XT-II nach 4-8 Wochen Kultivierung, Spur 9: pSM117-5-XT-II; neg. Kontrolle: Zellkulturüberstand von nicht transfizierten *High-Five*-Zellen.

Im Zellkulturüberstand der polyklonalen, stabilen *High-Five*-Klone konnte erstmalig eine Proteinexpression der humanen XT-II nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der nur transienten Expression der XT-I werden von XT-II jedoch nur sehr geringe Proteinmengen detektiert, die sowohl bei dem Vektor pSM72-3-XT-II wie pSM117-5-XT-II zu erkennen sind. Die Banden zeigen eine dem berechneten Molekulargewicht entsprechenden Größe von ca. 100 kDa.

Beide rekombinanten Proteine der XT-I und XT-II besitzen ein sehr ähnliches Molekulargewicht, so dass sie nicht aufgrund der Größe unterschieden werden können. Weiterhin ist die immunologische Detektion mit dem Anti-V5-Antikörper kein proteinspezifischer Nachweis, da beide Enzyme als Fusionsprotein mit dem V5-Epitop exprimiert werden. Somit sind weitere Analysen notwendig, um die spezifische Expression der XT-II in Insektenzellen nachzuweisen.

Die Western-Blot-Analyse wurde für die Fraktionen aus Spur 1 (XT-I) und Spur 4- 7 (XT-II) mit einem für die N-terminale Region der XT-I spezifischen Antikörper wiederholt (Abb.28). Das monospezifische, polyklonale Antiserum gegen XT-I-homologe Peptide sollte die Unterscheidung zwischen beiden Enzymen ermöglichen. Als Sekundärantikörper wird Ziege F(ab')₂-Fragment Anti-*rabbit*-IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet, der Primärantikörper wurde 1:1000 verdünnt.

Peptid	Sequenz	Antiserum (Primärantikörper)
OEK3	NH ₂ - CSRQKELLKRKLEQQEK -COOH	Kaninchen-anti-OEK3, 2061

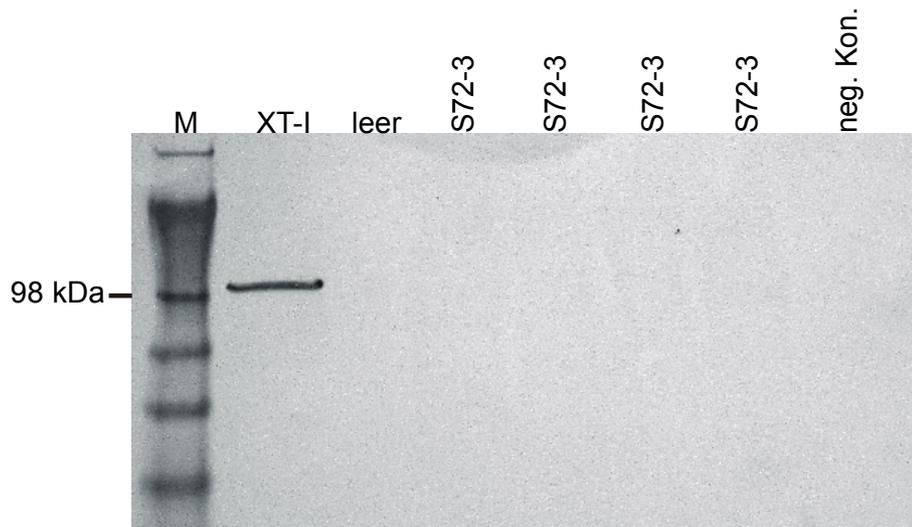


Abb. 28: Western-Blot zur Detektion des XT-I Proteins mit dem OEK3-Antiserum.

Als Primärantikörper wurde das Kaninchen-anti-OEK3-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, der Sekundärantikörper Ziege F(ab')₂-Fragment Anti-rabbit-IgG wurde 1:2000 verdünnt. Die Detektion der XT-I konnte mit dem OEK3-Antiserum erfolgen, die Spuren mit pSM72-3-XT-II zeigen keine Banden.

4.1.8.6. Analyse der Genexpression mittels *Real-Time PCR* am *LightCycler*

Um die Genexpression auf RNA-Ebene quantitativ zwischen den Insektenzell-Klonen der XT-I und XT-II vergleichen zu können, sollte eine Analyse am *LightCycler* durchgeführt werden.

Für die Detektion der PCR-Produkte mit dem *LightCycler*-System wurden sequenzspezifische Hybridisierungssonden verwendet, die an eine bei XT-I und XT-II homologe Region binden. Die Sensorsonde ist mit dem Farbstoff LC Red 640 und die Ankersonde mit 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) gekoppelt. Die Primer wurden in einem Sequenz-*Alignment* der humanen XT-I und XT-II so gewählt, dass diese zu dem jeweils anderen Enzym nur geringe Homologien aufweisen. Alle Primerpaare sind Intron-überspannend und liefern daher nur mit gespleißter mRNA als Matrize PCR-Produkte der gewünschten Größe.

Als *Template* wurde aus den *High-Five*-Zellen isolierte Gesamt-RNA verwendet. Für die RNA-Isolierung wurde das *NucleoSpin RNA II Kit* eingesetzt, das auf dem Prinzip einer Säulen-Affinitätschromatographie basiert. Für alle RNA-Isolierungen wurden parallel kultivierte *High-Five*-Zellen (10^6 -Zellen) verwendet, sowie Kulturen der stabilen XT-I- und XT-II-Klone (Tab. 4). Eine Auftrennung der jeweils isolierten RNA-Proben über eine Formamid-Agarosegelelektrophorese zeigte Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Proben (Abb. 29).

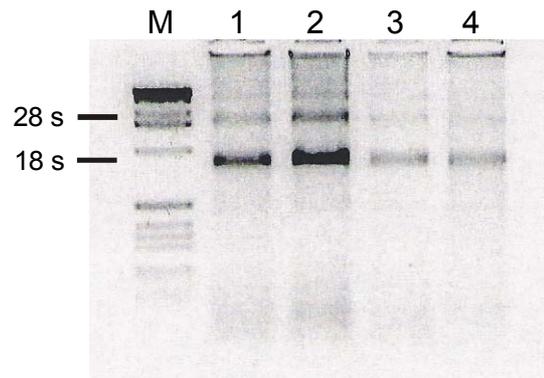


Abb. 29: Formamid-Agarosegelelektrophorese der RNA-Isolierung aus *High-Five*-Zellen.

Spur M: 1 kb DNA-Längenstandard; Spur 1: RNA-Extrakt aus nicht transfizierten *High-Five*; Spur 2: RNA-Extrakt aus stabilen pCG255-XT-I-Klon, Spur 3: RNA-Extrakt aus stabilen pSM72-3-XT-II-Klon; Spur 4: RNA-Extrakt aus stabilen pSM117-5-XT-II-Klon. Die charakteristischen 28 s und 18 s rRNA-Banden sind in allen Proben zu erkennen.

Proben-Nr.	Zelllinie
1	<i>High-Five</i> -Zellen
2	pCG255-XT-I stabiler <i>High-Five</i> -Klon
3	pSM72-3-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon
4	PSM117-5-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon

Tab. 4: Übersicht über die verschiedenen Insektenzellen, die für die RNA-Isolierung jeweils eingesetzt wurden.

Die quantitative Analyse der XT-mRNA-Konzentration wurde auf dem *LightCycler*-System durchgeführt. Die verwendeten Insektenzellen besitzen vermutlich wie auch *Drosophila* nur 1 Gen für eine Xylosyltransferase, so dass der Beitrag der XT-Genexpression der Insektenzellen zu unspezifischen PCR-Produkten führen könnte bzw. eine Basistranskriptionsrate zu detektieren ist. Trotzdem sollte eine Differenzierung zwischen XT-I und XT-II möglich sein, da bei stabiler Integration in das Genom aufgrund des starken *OpIE2* Promotors eine deutlich höhere RNA-Konzentration zu erwarten ist als bei nicht-transfizierten Zellen.

Die *Real-Time* PCR (Abb. 30) lieferte für Probe 2 mit XT-I-spezifischen Primer einen deutlich niedrigeren C_P -Wert als bei allen anderen getesteten Proben (Tab. 5), wobei ein niedriger C_P -Wert auf eine hohe *Template*-Konzentration hindeutet. Das *Template* stammte bei dieser Probe aus dem stabilen XT-I-Klon, daher weist dieses Ergebnis darauf hin, dass bei diesen Zellen tatsächlich erfolgreich eine stabile Insertion der XT-I-Sequenz erfolgt ist. Die Proben 1, 3 und 4 liefern ebenso ein PCR-Produkt, dieses besitzt jedoch bei allen drei Proben einen C_P -Wert von ca. 30, wobei Probe 1 die nicht-transfizierten *High-Five*-Zellen, Probe 3 und 4 stabile XT-II-Klone darstellen. Das erhaltene PCR-Produkt könnte daher den XT-Genexpressionsbeitrag aus den Insektenzellen repräsentieren.

Die Amplifikation am *LightCycler* mit XT-II-spezifischen Primern (Abb. 31) lieferte für die Proben 3 und 4 niedrige C_P -Werte von ca. 21 (Tab. 6), wobei Proben aus nicht-transfizierten Zellen und der XT-I-Klon einen Wert von ca. 33 zeigten. Auch mit den XT-II-Primern scheint zunächst mit jedem getesteten *Template* ein PCR-Produkt entstanden zu sein, die deutliche Differenz der C_P -Werte deutet darauf hin, dass bei den XT-II-Klone tatsächlich eine stabile Insertion erfolgt ist.

Um die Spezifität der entstandenen Amplifikate beurteilen zu können, sind weitere Analysen notwendig.

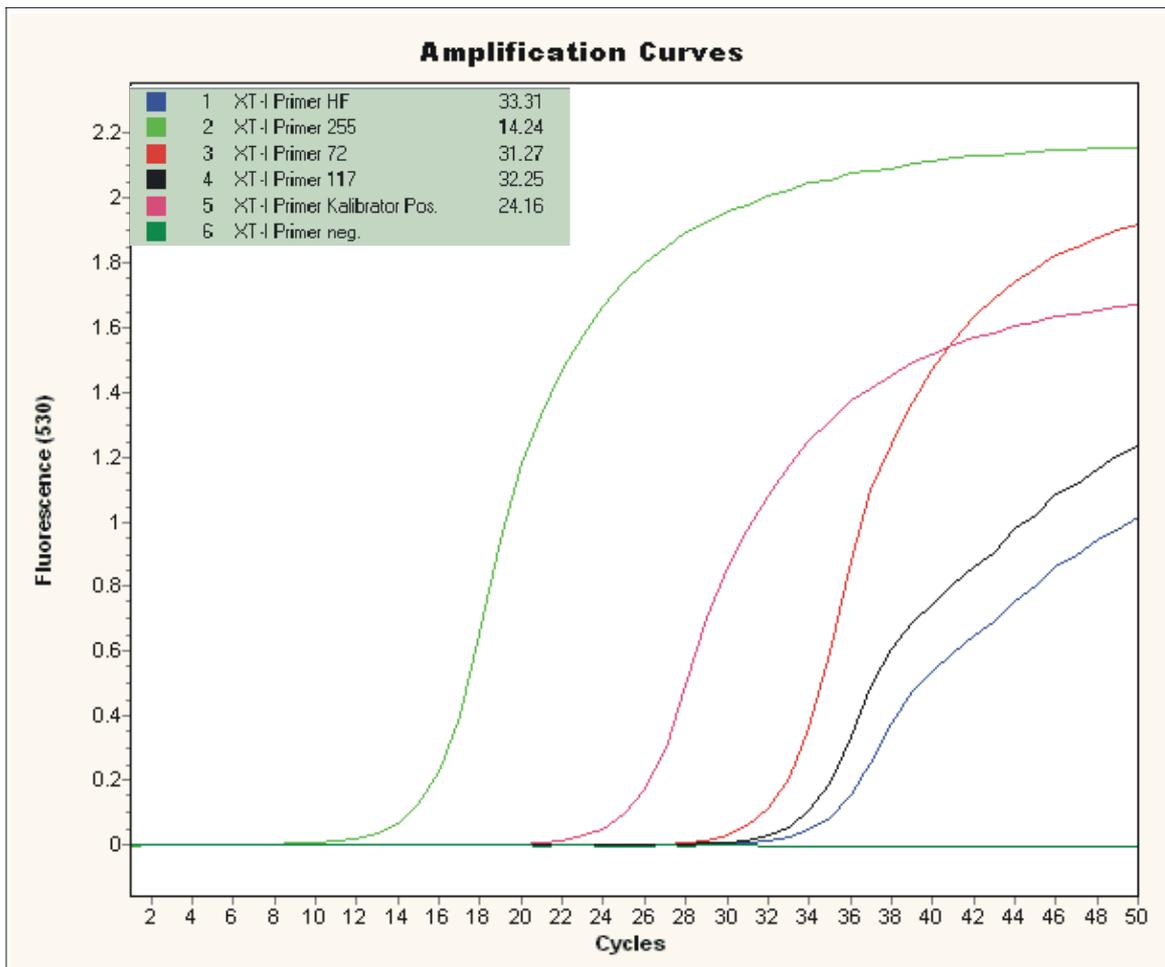


Abb. 30: Analyse der XT-I-mRNA-Konzentration.

Die Proben wurden bezüglich der XT-I-Genexpression untersucht. Probe 1 stammt von nicht transfizierten *High-Five*-Zellen; Probe 2: stabiler pCG255-XT-I-Klon; Probe 3: stabiler pSM72-3-XT-II-Klon; Probe 4: stabiler pSM117-5-XT-II-Klon; Probe 5: pos. Kontrolle; Probe 6 ist eine Kontrollprobe ohne *Template*.

Proben-Nr.	Zelllinie	C _p -Wert
1	<i>High-Five</i> -Zellen	33,31
2	pCG255-XT-I stabiler <i>High-Five</i> -Klon	14,24
3	pSM72-3-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon	31,27
4	PSM117-5-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon	32,25

Tab. 5: Analyse der spezifischen Unterschiede bei der Genexpression der XT-I.

Dargestellt sind die ermittelten C_p-Werte mit für XT-I-spezifischen Primern. Probe 2 besitzt einen deutlich niedrigeren C_p-Wert im Vergleich zu den übrigen Proben.

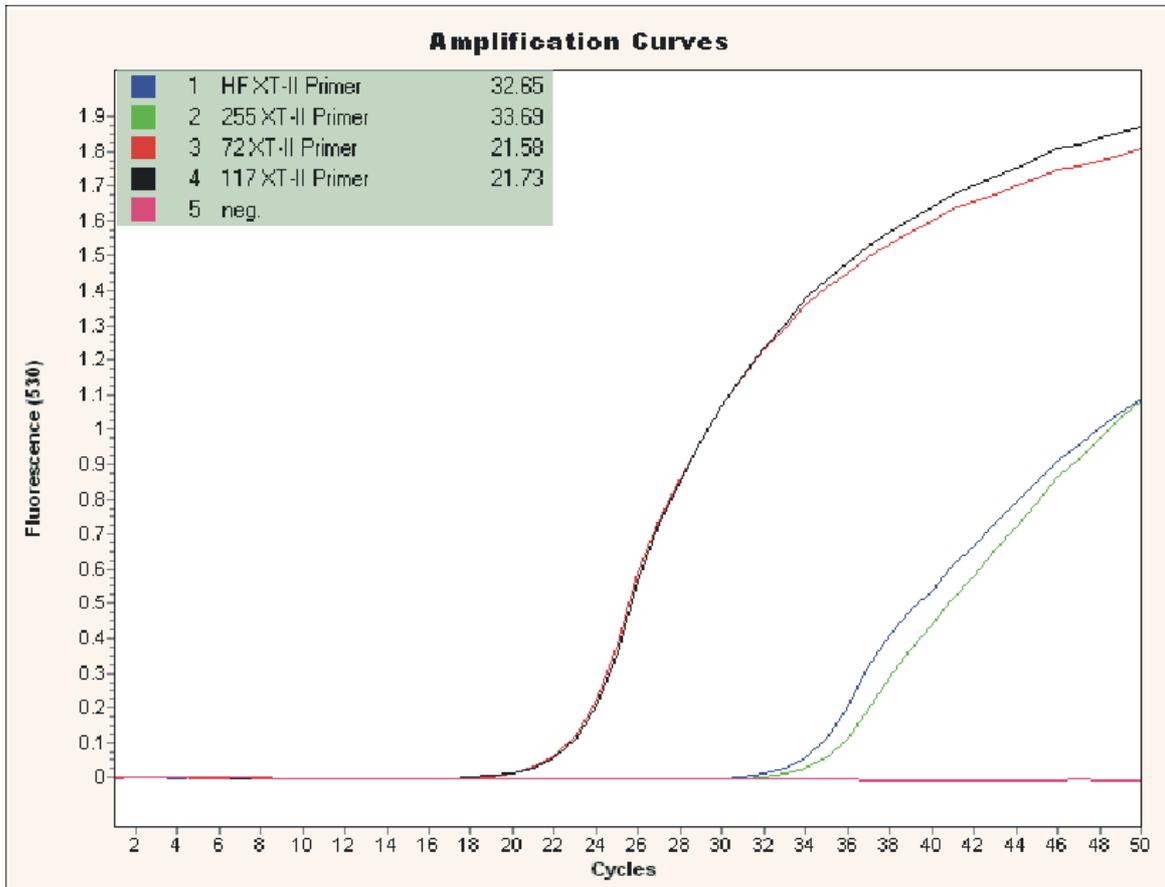


Abb. 31: Analyse der XT-II-mRNA-Konzentration.

Die Proben wurden bezüglich der XT-II-Genexpression untersucht. Probe 1 stammt von nicht transfizierten *High-Five*-Zellen; Probe 2: stabiler pCG255-XT-I-Klon; Probe 3: stabiler pSM72-3-XT-II-Klon; Probe 4: stabiler pSM117-5-XT-II-Klon; Probe 5 ist eine Kontrollprobe ohne *Template*.

Proben-Nr.	Zelllinie	C _p -Wert
1	<i>High-Five</i> -Zellen	32,65
2	pCG255-XT-I stabiler <i>High-Five</i> -Klon	33,69
3	pSM72-3-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon	21,58
4	PSM117-5-XT-II stabiler <i>High-Five</i> -Klon	21,73

Tab. 6: Analyse der spezifischen Unterschiede bei der Genexpression der XT-II.

Dargestellt sind die ermittelten C_p-Werte mit für XT-II-spezifischen Primern.

Um die PCR-Produktgröße und damit einen Hinweis auf die Spezifität des Amplifikats zu erhalten, wurden die *LightCycler*-Ansätze im Agarosegel aufgetrennt (Abb. 32).

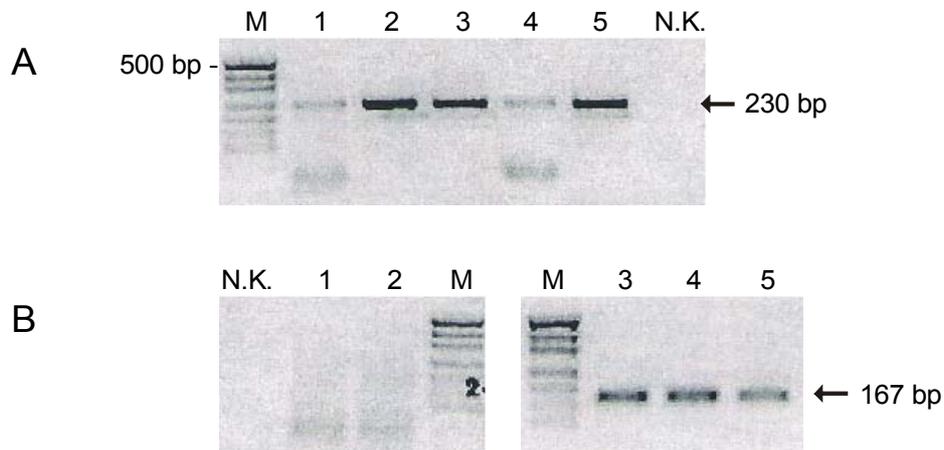


Abb. 32: Agarosegel der Amplifikate aus der *Real-Time* PCR.

Bei A und B wurden jeweils folgende Templates eingesetzt: Spur 1: *High-Five*-Zellen; Spur 2: XT-I-Klon, Spur 3: XT-II-Klon; Spur 4: XT-II-Klon; Spur 5: Positiv-Kontrolle.

Bild A: Mit XT-I-spezifischen Primern erhaltenes Produkt von 230 bp.

Bild B: Das mit XT-II-spezifischen Primern erhaltene Produkt von 167 bp ist nur bei den XT-II-Klonen in Spur 3 und 4 zu erkennen; Spur 5: Positiv-Kontrolle.

Die in Abb. 32A dargestellte Agarosegelelektrophorese der mit XT-I-spezifischen Primern erhaltenen Amplifikate zeigt mit jedem eingesetzten Template ein Produkt von 230 bp. Vermutlich binden die für humane XT-I spezifischen Primer auch an die XT-cDNA aus Insektenzellen und ergeben so in jeder Probe ein Amplifikat, so dass eine Differenzierung zwischen XT-I und XT-II hier nicht möglich ist.

Ein spezifisches Ergebnis liefert jedoch die Analyse in Abb. 32B, wo deutlich in den Spuren 3, 4 und 5 das für XT-II-spezifische Produkt von 167 bp zu erkennen ist, welches in den Spuren 1 und 2 fehlt. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass Insektenzellen tatsächlich nur eine Xylosyltransferase besitzen und dass die stabilen XT-II-Klone spezifisch sind.

Einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkt erhält man durch die Untersuchung der Schmelzkurvencharakteristik. Die Temperatur, bei der eine räumliche Trennung von Donor- und Akzeptor-Sonde erfolgt und somit eine Senkung des Fluoreszenzsignals verursacht, wird als Schmelztemperatur bezeichnet. Die Schmelztemperatur wird dabei als Maximum der Veränderung des Fluoreszenzsignals definiert. Die Analyse von Schmelzkurven ergab für das Schmelzverhalten von Sonden-Primern für XT-II-Amplifikate eine Temperatur von 88°C, während unspezifische PCR-Produkte an deutlich niedrigeren Schmelztemperaturen zu erkennen waren.

Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Analysen am *LightCycler* gefolgert werden, dass die Generierung eines stabilen XT-II-Klons in Insektenzellen erfolgreich durchgeführt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die aus XT-II-Klonen isolierte Gesamt-RNA deutlich höhere Konzentrationen an XT-II-mRNA im Vergleich zu nicht transfizierten *High-Five*-Zellen besitzt. Die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte konnte durch Größenbestimmung im Agarosegel und Schmelzkurvenanalytik eindeutig bestimmt werden.

4.1.9. Untersuchung der XT-II-Aktivität

Die rekombinante XT-II sollte in weiteren Untersuchungen auf ihre spezifische Aktivität analysiert werden. Bisher sind Substrat und Akzeptor der humanen XT-II völlig unbekannt und daher kann aus der hohen Homologie zu XT-I zunächst nur vermutet werden, dass dieses Enzym eventuell Xylose übertragen könnte.

4.1.9.1. Einsatz verschiedener Akzeptoren

Im XT-Aktivitätstest wird der Xylosetransfer von UDP-[¹⁴C]Xylose auf einen Akzeptor gemessen. In einer ersten Analyse sollte der XT-Aktivitätstest und eine Modifikation dieses Tests mit der rekombinanten XT-II durchgeführt werden. Als potentielle Akzeptoren wurden Seidenfibroin, rekombinantes Bikunin und weitere Xyloseakzeptoren für XT-II getestet. Dazu wurden verschiedene Peptide, Serum und Proteinextrakt von diversen Zellsaten eingesetzt (Tab. 7). Es konnte kein Akzeptor für einen XT-II- vermittelten Xylose-Transfer unter den verwendeten Reaktionsbedingungen ermittelt werden.

Name	Sequenz
<i>Amyloid precursor-like protein (APLP2)</i>	NH ₂ -SENEGSGMAEQK-COOH
<i>pTH-Related Protein (human)</i>	NH ₂ -TRSAWLDSGVTGSGLEGD- HLSDTSTTSLELDSR-COOH
<i>Steroidogenesis-Aktivator Polypeptid (rat)</i>	NH ₂ -IVQPIISKLYGSGGPPTGE- EDTDEKKDEL-COOH
<i>Brain Natriuretic Peptid (human)</i>	NH ₂ -SPKMVQSGGCFGRKMDRIS- SSGLGCKVLRH-COOH
Bikunin-Peptid	NH ₂ -QEEEGSGGGQKK-COOH
bFGF (<i>bovine brain</i>)	NH ₂ -ALPEDGGSGAFPPGHFK-PKRLY-COOH
Decapeptid aus CH4 Domäne von IgE	NH ₂ -FVFFGSGGTK-COOH
Orcokinin	NH ₂ -NFDEIDRSGFGFN-COOH
<i>Atrial Natriuretic Factor (human)</i>	NH ₂ -RSSCFGGRMDRIGAQSG GCDSFRY- COOH
<i>C-Type Natriuretic Peptid (human)</i>	NH ₂ -GLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC-COOH
Seide	
rekombinantes Bikunin Protein	
humane Serum Proteine	
<i>E.coli</i> Proteinextrakt	
<i>Pichia pastoris</i> Extrakt	
JAR Proteinextrakt	
SW1353 Proteinextrakt	
Capan1 Proteinextrakt	
Capan2 Proteinextrakt	
HEK-293 Proteinextrakt	
<i>Chang Liver</i> Proteinextrakt	

Tab. 7: Übersicht der verwendeten potentiellen Akzeptoren für XT-II.

Für das rekombinante Protein von XT-II verliefen alle durchgeführten Tests negativ, dabei betrug die Nachweisgrenze 20 dpm nach 5 h Inkubation.

4.2. Untersuchungen zur Phylogenie der XT

Für phylogenetische Untersuchungen sollte die XT einer evolutionär sehr alten Spezies, wie z.B. den Knorpelfischen, analysiert werden. Die Knorpelfische sind eine Klasse der Kiefermäuler (*Gnathostomata*) und ihre bekanntesten Vertreter sind Haie und Rochen. Bei Knorpelfischen besteht das Skelett ausschließlich aus Knorpeln und ist nur zu einem geringen Anteil mineralisiert.

Bereits im Erdzeitalter des Devon vor etwa 400 bis 350 Millionen Jahren existierten erste haifischähnliche Arten, so dass die Knorpel- und Knochenfische heute nur noch entfernt miteinander verwandt sind. Da die XT-I das initiale Enzym für den Aufbau von Proteoglykanen darstellt, die den Hauptbestandteil von Knorpel bilden, wurde für die folgenden Untersuchungen XT vom Hai verwendet.

4.2.1. Homogenisierung von Hai-Geweben

Die Gewebeproben wurden von einem juvenilen Blauhai (*Prionace glauca*) mit einem Gewicht von ca. 15-20 kg und einer Größe von 150 cm erhalten. Es wurden 17 verschiedene Gewebeproben für die Analysen verwendet.

4.2.2. Bestimmung der XT-Aktivität

Ebenso wie die humane XT-I katalysiert auch das Enzym vom Hai den Transfer von Xylose von UDP-Xylose auf einen spezifischen Akzeptor mit der Aminosäuresequenz a-a-a-G-S-G-a-b-a, wobei a = E oder D und b = G, E oder D. Ein erster Vergleich von Seidenfibroin und rekombinantem Bikunin als Akzeptor für das Enzym vom Hai ergab, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur Seidenfibroin erkannt wurde. Der Einsatz von rekombinantem Bikunin als Akzeptor führte zu keiner messbaren Aktivität des Hai Enzyms.

Die XT-Aktivität der verschiedenen Hai-Gewebe wurde mittels radiochemischen Aktivitätstest quantifiziert und die spezifische Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind im folgenden Diagramm (Abb. 33) zusammengefasst.

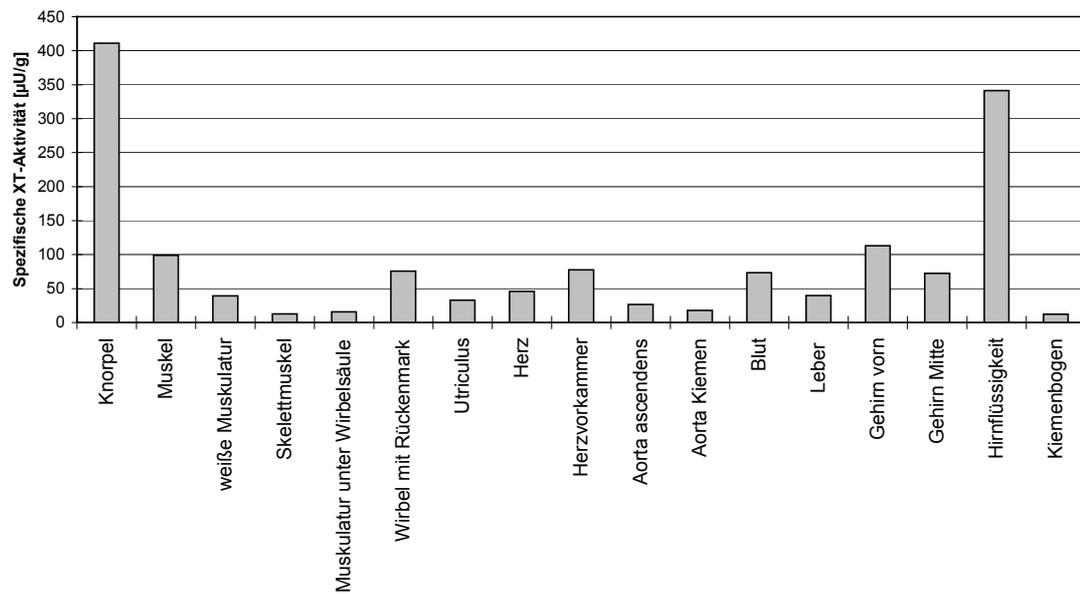


Abb. 33: Spezifische XT-Aktivität bestimmt in Gewebeproben vom Blauhai.

In der Mehrzahl der untersuchten Gewebeproben konnte eine spezifische XT-Aktivität von bis zu 100 µU/g ermittelt werden. Stark erhöhte Werte wurden im Knorpel (411 µU/g) und in Hirnflüssigkeit (341 µU/g) bestimmt.

4.2.3. Temperatur-Optimum der Hai-XT im Vergleich zur humanen XT-I

Ein Vergleich der beiden Enzyme von Mensch und Hai sollte durch die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur durchgeführt werden. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im Standard-XT-Aktivitätstest, wobei die Temperatur in einem Bereich von 18°C bis 41°C variiert wurde.

Die optimale Temperatur für das Enzym vom Hai scheint im Bereich von 18°C zu liegen (Abb. 34), während für die humane XT-I (Abb. 35) eine Temperatur von 37°C zu einer hohen katalytischen Aktivität führt. Bei einer Reaktionstemperatur von über 33°C verliert das Hai-Enzym deutlich an Aktivität, wogegen das humane Enzym erst bei Temperaturen über 41°C einen starken Aktivitätsverlust zeigt.

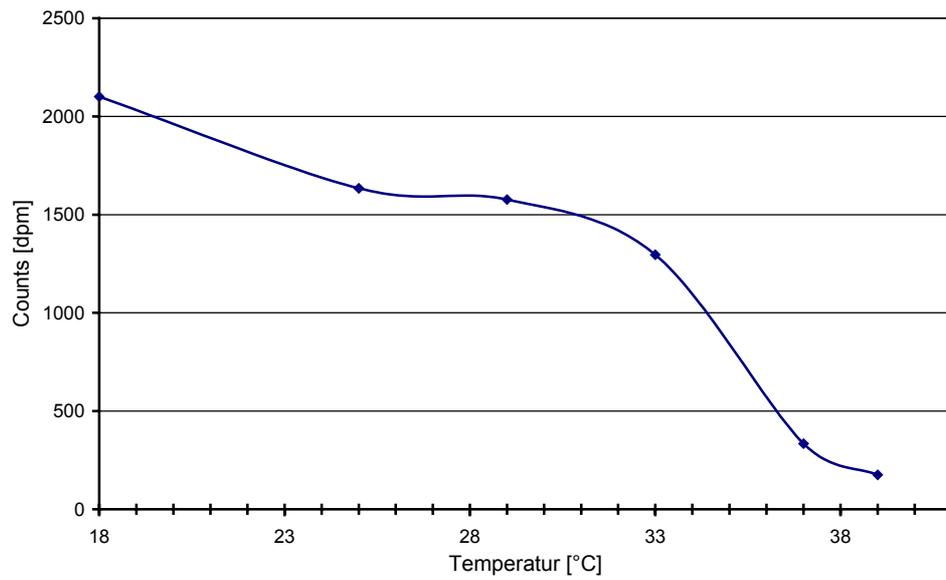


Abb. 34: Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität des Blauhai Enzyms.

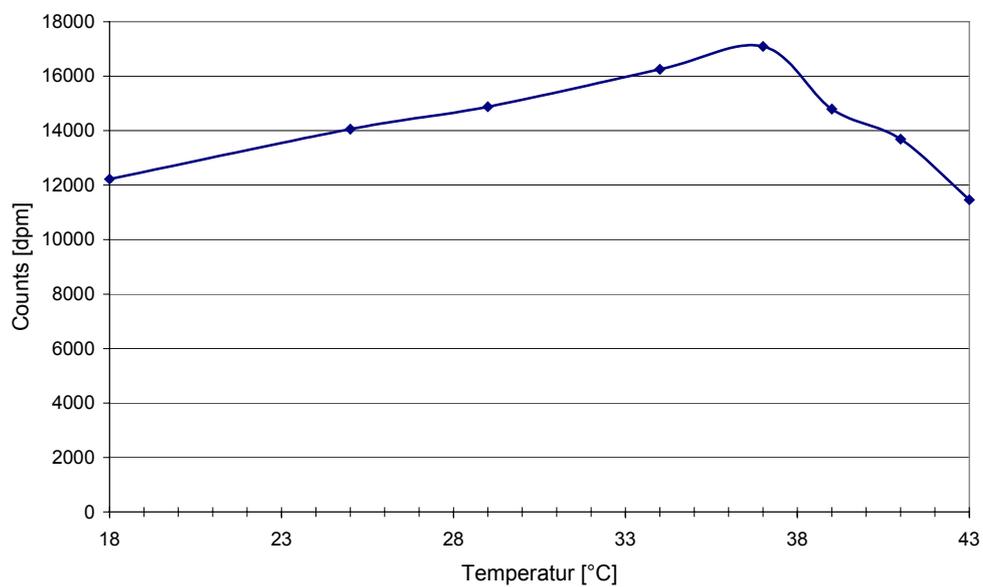


Abb. 35: Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität der humanen XT-I.

4.2.4. Einfluss von Heparin auf die Aktivität

Der Zusatz von 1 IU/ml Heparin führt bei der humanen XT-I zu einem Aktivitätsverlust von >70% und stellt einen nicht-kompetitiven Inhibitor für das humane Enzym dar. Der Effekt von Heparin auf das Hai-Enzym sollte in Aktivitätstests untersucht werden durch Zusatz von Heparin in einem Bereich von 10 bis 1000 IU/ml. Die detektierte Aktivität änderte sich mit steigender Heparin-Konzentration nur geringfügig, auch bei 1000 IU/ml Heparin sank die Aktivität des Hai-Enzyms nur auf ca. 83% ab (Abb. 36). Die effektive Bindung der humanen XT-I an Heparin bestätigt sich nicht unter den gewählten Reaktionsbedingungen für die Hai-XT.

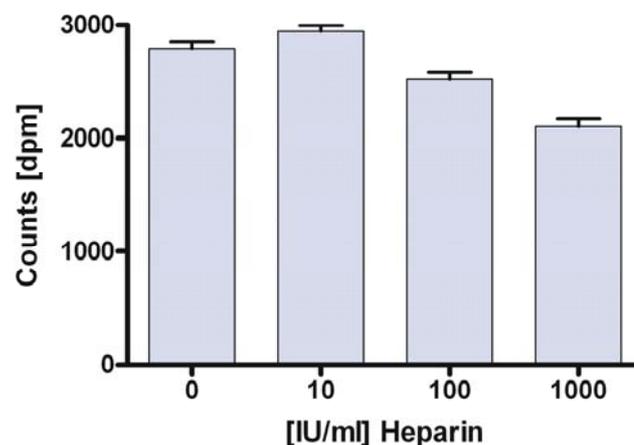


Abb. 36: Einfluss von Heparin auf die Aktivität der Hai-XT.

4.2.5. Einfluss von UDP auf die Aktivität

Da für viele Glykosyltransferasen UDP ein kompetitiver Inhibitor ist, sollte die Bedeutung von UDP für die enzymatische Aktivität der Hai-XT untersucht werden. Es wurden UDP-Konzentrationen verwendet, die auch das humane Enzym effizient inhibieren. Das Hai Enzym wurde durch den Zusatz von 0,25 mM UDP zu ca. 85% inhibiert (Abb. 37), daher ist die Nukleotid-Bindungsregion vermutlich ähnlich dem humanen Enzym.

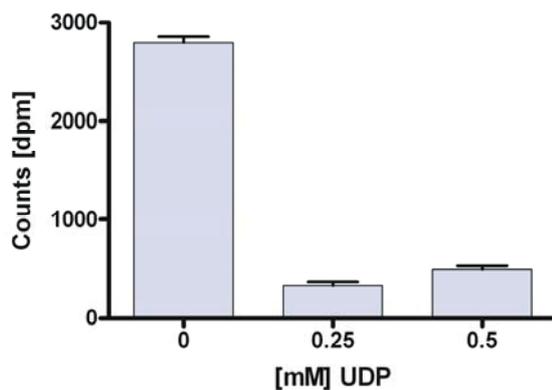


Abb. 37: Einfluss von UDP auf die Aktivität der Hai-XT.

4.2.6. Einfluss von N-Phenylmaleimid

Zur Analyse der Anzahl der vorhandenen Disulfidbrücken innerhalb eines Enzyms ist das Sulfhydryl-Gruppen spezifische N-Phenylmaleimid geeignet. Ist eine freie Thiolgruppen innerhalb der Aminosäuresequenz vorhanden, reagiert diese mit dem Imid und eine deutliche Absenkung der enzymatischen Aktivität würde resultieren.

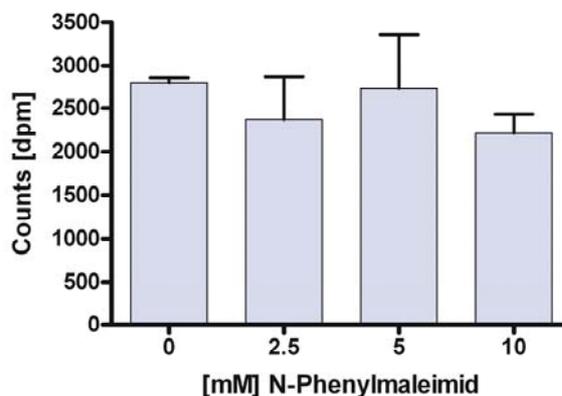


Abb. 38: Einfluss von N-Phenylmaleimid auf die Aktivität der Hai-XT.

Das Hai Enzym zeigt auch bei einer Konzentration von 10 mM N-Phenylmaleimid keinen signifikanten Verlust an Aktivität (Abb. 38), was darauf schließen lässt, dass keine freien Cystein-Reste in der Aminosäuresequenz vorhanden sind.

5. Diskussion

Glykosyltransferasen besitzen trotz ihrer divergenten Primärstruktur eine sehr ähnliche Domänenstruktur und gehören zu den Typ II Membranproteinen [2, 7]. Die Xylosyltransferase I ist ein Schlüsselenzym bei dem Aufbau der Proteoglykane. XT-I katalysiert den initialen Schritt der posttranslationalen Glykosaminoglykan-Biosynthese in Proteoglykanen durch den Transfer einer Xylose von UDP-Xylose auf bestimmte Serin-Reste des *Core*-Proteins [69]. Die Tatsache, daß hierbei nur bestimmte Serin-Reste des *Core*-Proteins, die Teil einer Consensus-Sequenz sind [70], xylosyliert werden, und die gemeinsame Sekretion von XT-I und Proteoglykanen in den extrazellulären Raum [93] deutet darauf hin, daß die XT-I eine regulatorische Funktion beim Aufbau der Bindegewebsmatrix besitzt.

Für die funktionelle und biochemische Charakterisierung, die Untersuchung von Substrat-Protein-Wechselwirkungen und die Analyse potentieller inhibitorischer Substanzen werden die humane XT-I und XT-II als rekombinante Proteine synthetisiert. Für die Charakterisierung der XT-I werden außerdem verschiedene Mutanten generiert, die eine umfassende Analyse der Struktur und Bindungseigenschaften ermöglichen sollen.

5.1 Identifizierung essentieller Cystein-Reste der XT-I

Die Suche nach homologen Enzymen zur XT-I und XT-II der *Mammalia* in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* zeigte potentielle Xylosyltransferasen in beiden Genomen auf [71, 94, 95]. Die Aminosäuresequenzen der Proteine dieser Spezies besitzen homologe Regionen mit den Säuger-Enzymen, einschließlich 9 hochkonservierten Cystein-Resten in der globulären katalytischen Domäne. Die humane XT-I sowie die Enzyme aus Maus und Ratte besitzen in der Primärsequenz insgesamt 15 Cystein-Reste, die auch zwischen den Spezies hoch konserviert sind. Das Cystein in Position 6 der humanen XT-I ist in der cytoplasmatischen Region lokalisiert und kann daher nicht an der Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sein, daher sind maximal 7 potentielle Disulfidbrücken im nativen Enzym möglich.

Als Grundlage für die Klonierung von Cystein-Mutanten diente der Basisvektor pCG255 Δ 1-148-XT-I, der für eine lösliche Form der humanen XT-I kodiert. Das rekombinante Enzym wird in *High-Five*-Insektenzellen exprimiert, besitzt eine hohe katalytische Aktivität und ist daher für die quantitative Analyse von Veränderungen innerhalb der Aktivität sehr gut geeignet. Die Bedeutung der 14 Cystein-Reste für die

Tertiärstruktur der XT-I und für die Erhaltung einer katalytischen Aktivität sollte durch individuelle gerichtete Mutagenese der Cystein-Reste analysiert werden. Mit der Methode der *site-directed* Mutagenese wurde jedes Cystein-Codon individuell zu einem Alanin-Codon mutiert, die Sequenz durch Sequenzierung bestätigt und die Mutante als rekombinantes Protein in *High-Five*-Zellen exprimiert.

Der immunologische Nachweis der Cystein-Mutanten im Western-Blot bestätigte ein vergleichbares Expressionsniveau der Proteine (Abb. 7B), was als unabdingbare Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Enzyme in den durchgeführten Assays notwendig ist. Die Analyse im Western-Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der Cystein-Mutanten (Abb. 7C) untereinander und im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Vermutlich führen die eingefügten Mutationen innerhalb der Tertiärstruktur zu Veränderungen, die eine leicht erhöhte Mobilität im Gel ermöglicht. Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich weiterhin folgern, dass die Wildtyp-XT-I in aktiver Form als Monomer vorliegt und keine Dimerisierung erfolgt, wie sie bei anderen Glykosyltransferasen bereits beobachtet wurde [26]. Vielmehr werden nur intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet, wobei der Aktivitätsverlust durch den Zusatz von reduzierenden Agenzien darauf hinweist, dass die Disulfidbrücken eher für die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur notwendig sind, als das freie Cysteine direkt an der Katalyse im reaktiven Zentrum beteiligt sind.

Die Bestimmung der Anzahl der Disulfidbrücken in der humanen XT-I war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die Bedeutung von 14 Cystein-Resten für die Ausbildung von Disulfiden und für die katalytische Aktivität sollte unter Verwendung der Cystein-Mutanten untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Aktivität der einzelnen Mutanten im radiochemischen Aktivitätstest quantifiziert und im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ausgewertet (Abb. 7A). Die erhaltenen Ergebnisse lassen folgern, dass mindestens 5 Cystein-Reste essentiell für die Erhaltung einer enzymatisch aktiven Form der XT-I sind. Die Tatsache, dass die Substitution der konservierten Cysteine zu Alanin nur eine geringe Auswirkung auf die kinetischen Eigenschaften der Enzyme besitzt, lässt folgern, dass die invarianten Cystein-Reste vermutlich nicht direkt an der Substratbindung beteiligt sind.

Für weitere Analysen der aktiven Konformation der XT-I wurden die rekombinanten Proteine zunächst mit N-Phenylmaleimid inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt. N-Phenylmaleimid ist ein Sulfhydryl-Gruppen spezifisches Reagenz, das mit freien Cystein-Resten reagiert und eine Inaktivierung des Enzyms bewirken würde. Die Ergebnisse dieser Analysen haben gezeigt, dass der Zusatz von N-Phenylmaleimid zur

Wildtyp-XT-I keine Auswirkungen auf die Aktivität besitzt, während alle in aktiver Form exprimierten Mutanten einen deutlichen Aktivitätsverlust zeigten. Daraus lässt sich schließen, dass die humane XT-I insgesamt über 7 Disulfidbrücken verfügt und keine freien Cystein-Reste vorliegen. Bei den Untersuchungen mit den Mutanten C257A, C927A und C933A konnte außerdem eine unterschiedliche Sensitivität für das Imid beobachtet werden (Abb. 9). Auf niedrige Konzentrationen von 5 mM N-Phenylmaleimid reagierten diese Mutanten mit einem Aktivitätsverlust von maximal 15 % im Vergleich zu den anderen getesteten Mutanten, die zwischen 30-50% Aktivitätsverlust aufwiesen. Ein möglicher Grund für die geringere Sensitivität bestimmter Cystein-Mutanten könnte in der Position der Cys-Reste in der Aminosäuresequenz liegen. Denkbar ist, dass der freie Cystein-Rest durch sterische Hinderung schlecht zugänglich ist für das relativ große Molekül, und daher erst bei höheren Konzentrationen eine vollständige Reaktion erfolgt. Fünf Mutanten konnten unter diesen Bedingungen nicht analysiert werden, da diese nur eine sehr geringe Restaktivität aufwiesen und ein Aktivitätsverlust nicht ausreichend detektiert werden konnte.

UDP ist ein kompetitiver Inhibitor für viele Glykosyltransferasen, einschließlich der humanen XT-I [90, 91]. Bereits geringe UDP-Konzentrationen von 0,25 mM führen zu einem 98%igen Aktivitätsverlust des Enzyms. Die Kinetik der Inhibition durch UDP war sowohl bei der rekombinanten löslichen Form der XT-I wie bei dem humanen Enzym, welches aus Zellkulturüberstand aus JAR-Zellen isoliert wurde, vergleichbar [96]. Auch die Inhibition der Cystein-Mutanten mit UDP zeigte bei fast allen untersuchten Enzymen keine signifikante Veränderung. Dagegen zeigte die C561A-Mutante eine schwächere Inhibition durch UDP (Abb. 13). Dieses Ergebnis könnte einen interessanten Hinweis darstellen, da Cys⁵⁶¹ in einer Aminosäuresequenz lokalisiert ist, die potentiell in die Bindung der Nukleotid-Zucker involviert ist [71]. Dieses müsste jedoch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden. Untersuchungen zur Bindung der Cystein-Mutanten an UDP-Beads konnten keinen Unterschied in der Bindungscharakteristik der Mutanten aufzeigen. Allerdings war es auch eher nicht zu erwarten, dass durch den immunologischen Nachweis der an die UDP-Beads gebundenen Enzymmenge eine exakte Quantifizierung möglich ist. Vielfältige Fehlermöglichkeiten fließen in das Ergebnis mit ein, was bei der Auswertung zu berücksichtigen ist. Zum Einen ist eine genaue Abmessung des Volumens der in Lösung befindlichen UDP-Beads sehr schwierig und kann daher differieren. Mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte sind mit den Proben durchzuführen, bevor sie durch Aufkochen in einem sehr kleinen Volumen von 20 µl zur SDS-PAGE Analyse eingesetzt werden. Daher ist dieses Verfahren zwar dafür geeignet, die Bindung eines Proteins an die Beads zu zeigen, eine exakte Quantifizierungen der

gebundenen Proteinmenge kann dieses Verfahren nicht leisten. Im Ergebnis konnte daher die effiziente Bindung aller Cystein-Mutanten an UDP gezeigt werden, die signifikant schwächere Inhibition der C561A-Mutante müsste Grundlage für weitere Untersuchungen sein.

Die starke Bindung der humanen XT-I an Heparin ist bereits in der Literatur beschrieben und für die effektive Aufreinigung durch Heparin-Affinitätschromatographie eingesetzt worden [77-79]. Innerhalb dieser Arbeit konnte auch für die Cystein-Mutanten eine effiziente Bindung an Heparin beschrieben werden. Dieses Ergebnis impliziert, dass die eingefügten Mutationen keine Destruktion der Heparin-Bindungsregion bewirken.

5.2 Aminoternale XT-I-Mutanten und Heparinbindungsregion der XT-I

Die Bedeutung der N-terminalen Region für die Aktivität des Enzyms sollte durch die Klonierung von Deletionsmutanten und anschließender Expression der verkürzten Enzyme untersucht werden. Als erster Schritt wurden in einem Sequenzvergleich der bekannten Xylosyltransferasen aus verschiedenen Spezies diejenigen N-terminalen Aminosäuren identifiziert, die hoch-konserviert sind (Abb. 17). Das *Alignment* lieferte erste Hinweise auf mögliche essentielle Regionen in der Aminosäuresequenz des Enzyms, die zur Erhaltung der katalytischen Aktivität notwendig sind. Es wurde ein Vielzahl von Expressionsvektoren auf der Grundlage des Basisvektors pCG255 Δ 1-148-XT-I kloniert, wobei jedoch nur ca. 40% der Vektoren zu einer Proteinexpression in Insektenzellen führten. Die Expression von verkürzten Varianten der XT-I erwies sich innerhalb dieser Arbeit als sehr diffizil. Konnte bei den N-terminal verkürzten XT-I-Mutanten immerhin eine Expression in ca. 40% der Fälle der klonierten Vektoren erreicht werden, so war ein Expressionsnachweis von C-terminal verkürzten XT-I-Varianten nicht möglich. Bereits geringfügig verkürzte Sequenzen führten dazu, dass keine Proteinexpression mehr nachweisbar war.

Die Expression von 9 N-terminalen Deletionsmutanten der XT-I lieferte vergleichbare Enzymmengen ähnlich der Wildtyp-XT-I (Abb. 19). Durch den radiochemischen Aktivitätstest konnte ein fast vollständiger Aktivitätsverlust zwischen der Mutante delta 1-260XT-I und der Mutante delta1-272XT-I detektiert werden. Dieses Ergebnis weist auf die Bedeutung dieser Region aus 12 Aminosäuren für die Erhaltung der enzymatischen Aktivität der XT-I hin. Einen weiteren Hinweis liefert das Ergebnis der Cystein-Mutanten, wo gezeigt werden konnte, dass Cys²⁷⁶ essentiell ist für die Aktivität der XT-I, da die

Substitution dieses Restes durch Alanin zu einem Enzym mit einer Restaktivität von ca. 10% führt. Nicht geklärt werden konnte bisher die Frage, ob durch das fehlende Cys²⁷⁶ die dreidimensionale Struktur des Enzyms nachhaltig zerstört wird, oder ob andere Aminosäuren in der Region zwischen Position 260-272 eventuell eine Funktion bei der Katalyse besitzen. Diese Fragen könnten durch die Klonierung weiterer Deletionsmutanten oder auch durch die Substitution einzelner Aminosäuren untersucht werden.

Auch die N-terminalen Deletionsmutanten, die über Aktivität verfügen, sollten auf ihre Inhibierung durch Heparin untersucht werden. Die [Δ 1-184]XT-I, [Δ 1-213]XT-I, [Δ 1-260]XT-I und [Δ 1-266]XT-I Mutanten konnten effektiv durch den Zusatz von 1 IU/ml Heparin inhibiert werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Heparinbindungsstelle nicht in der N-terminalen Region lokalisiert ist. Die fünf inaktiven N-terminalen Mutanten wurden durch die Bindung an immobilisiertem Heparin analysiert, wobei der Anteil an gebundenem Enzym durch Western-Blot detektiert wurde (Abb. 22). Die Auswertung ergab für die zwei kürzesten XT-I-Mutanten, [Δ 1-289]XT-I und [Δ 1-568]XT-I, anscheinend eine leicht geringere Bindung an Heparin. Die dreidimensionale Struktur der Heparinbindungsregion dieser Mutanten könnte so verändert sein, dass es nur zu unzureichenden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat kommt. Offen ist dabei die Frage, ob es sich bei der Bindungsregion für Heparin um eine dreidimensionale Struktur handelt oder ob die Bindung durch eine Consensus-Sequenz in der Aminosäuresequenz vermittelt wird. Um diese Frage aufzuklären, wurde eine Western-Blot-Analyse mit der Wildtyp-XT-I durchgeführt, nachdem das Protein denaturiert und an immobilisiertes Heparin gebunden wurde (Abb. 23). Da auch das denaturierte Protein sehr effektiv an Heparin gebunden wird, kann man aus den erhaltenen Ergebnissen folgern, dass die Bindung der XT-I an Heparin nicht auf einer dreidimensionalen Struktur beruht.

Eine weitere Möglichkeit, die diskutiert werden sollte, ist, dass die Bindung an Heparin eventuell nicht nur auf einer Bindungsregion beruht, sondern auch durch eine Vielzahl von basischen Resten vermittelt werden könnte. Bei der Analyse der Primärstruktur ist eine hohe Anzahl an basischen Resten aufgefallen, die in Clustern von 2 oder 3 Resten über die gesamte Sequenz verstreut liegen. Diese recht spekulativen Annahmen wären in weiteren Untersuchungen auf ihre Bedeutung für die XT-I zu analysieren.

Einen anderen Ansatz für die Analyse der Heparinbindungsstelle bieten die Untersuchungen von Cardin und Weintraub mit Peptiden einer spezifischen Consensus-Sequenz [80]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Peptide eine hohe Affinität für Heparin und Proteoglykane aus Endothelzellen aufweisen [84]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es auch denkbar, dass in der Primärsequenz der XT-I eine entsprechende Sequenz vorhanden ist. Analysen der Aminosäuresequenz der XT-I zeigten eine zu den postulierten Aminosäure-Clustern ähnliche Sequenz (Abb. 24), die in allen trunkierten Enzymen noch vorhanden war. Untersuchungen mit Mutanten, in denen diese Aminosäuren deletiert sind, würden eine Aufklärung dieser Fragestellung ermöglichen.

XT-I wird zu der Glykosyltransferase-Familie Nr. 14 gezählt, wobei nicht alle Mitglieder dieser Enzymfamilie einander entsprechende Sequenzmotive besitzen. In der Literatur wird über die Rolle einzelner Sequenzmotive diskutiert, die nicht in allen Enzymen aus dieser Familie zu finden sind [71, 97]. Die hoch variable N-terminale Region der Xylosyltransferasen aus verschiedenen Spezies besitzen alle ein gemeinsames Pro-Xaa-Cys-Asp/Glu Motiv, welches nach vorläufigen Daten der Wilson Arbeitsgruppe [71] vermutlich notwendig ist für die katalytische Aktivität der *Drosophila* Xylosyltransferase. Das beschriebene Motiv ist auch in der Sequenz der humanen XT-I vorhanden, und zwar in der Position Pro²⁵⁵-Asp²⁵⁸ und Pro⁵⁴⁰-Asp⁵⁴³. Innerhalb dieser Arbeit konnte durch die N-terminalen Deletionsmutanten gezeigt werden, dass der Verlust des ersten Motivs keine Auswirkungen auf die Aktivität der humanen XT-I besitzt. Zusätzlich konnte durch die Expression der C542A Mutante dargestellt werden, die innerhalb des 2. Motivs einen Cystein zu Alanin Austausch besitzt, dass dieses Enzym einen Aktivitätsverlust von 70% aufweist. Daraus lässt sich folgern, dass das 1. Motiv keine Bedeutung für die katalytische Aktivität besitzt, während das 2. Motiv offensichtlich eine Funktion besitzt, die sowohl aus einer direkten Beteiligung innerhalb des katalytischen Zentrums bestehen kann, wie auch einer Strukturstabilisierung, was jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

5.3 Expression der humanen XT-II

Für das Enzym der humanen XT-II war es bisher nicht gelungen, ein Expressionssystem zu etablieren und das Protein in rekombinanter Form darzustellen. Daher wurden zunächst 2 verschiedene Strategien verfolgt, um die XT-II zu exprimieren und damit die Grundlage für eine Analyse der katalytischen Aktivität zu erstellen. Sowohl die Klonierung von Expressionsvektoren, die für die vollständige Sequenz der XT-II kodieren, als auch Vektoren mit verkürzten Varianten führten zunächst zu keiner nachweisbaren Proteinexpression in Insektenzellen.

Da keine der Strategien zu einer erfolgreichen Expression der XT-II geführt hatten, wurde eine Kontrollexpression in *E.coli* durchgeführt. Es wurden dafür Klone verwendet, die jeweils die kodierende DNA-Sequenz für XT-I bzw. XT-II in einem pET102 Expressionsvektor trugen. Die Analyse der Bakterienkultur zeigte, dass beide Proteine erfolgreich und mit hoher Ausbeute exprimiert wurden, jedoch lagen beide Enzyme in inaktiver Form vor. Daher war dieses System zwar für die Expression geeignet, ermöglichte aber nicht die weitere Analyse der Funktion der XT-II.

Bei dem Insektenexpressionssystem bestand die Vermutung, dass es sich um ein Konzentrationsproblem handelte, da das System grundsätzlich für die Expression sehr ähnlicher Proteine, wie der XT-I, geeignet war. Es war daher nach einer Möglichkeit zu suchen, die Proteinexpression erheblich zu steigern, bzw. einen sensitiveren Nachweis für die XT-II-Expression zu etablieren. Ein Weg, die Proteinexpression zu steigern, könnte in der Selektion und Etablierung eines stabilen XT-II-Insektenzellklons liegen. Der Vektor pMIB/V5-His-A vermittelt eine Resistenz gegen Blasticidin und ermöglicht daher die Selektion stabiler Klone. Nach wenigen Tagen Kultivierung im Selektionsmedium waren ca. 95% der Zellen abgestorben, daher wurde auf eine Vereinzlung der Zellen verzichtet, die eventuell zu einer Wachstumsinhibierung hätte führen können, und es wurde eine polyklonale Zelllinie etabliert. Nachdem die Zellen wieder eine regelmäßige Generationszeit von 24 h aufwiesen, wurde kontinuierlich die Proteinexpression durch Western-Blot analysiert. Nach ca. 4 Wochen konnte in einigen Fraktionen des Zellkulturüberstandes verschiedener XT-II-Klone eine Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 27). Da der Nachweis nicht mit einem für XT-II-spezifischen Antikörper erfolgt ist, waren jedoch weitere Analysen notwendig. Die Verwendung von polyklonalen Antisera gegen ein XT-II-homologes Peptid zeigte keinen spezifischen Nachweis der XT-II, sondern ergab eine sehr starke Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen.

Um die Differenzierung zwischen XT-I und XT-II zu ermöglichen, wurde in einer weiteren Western-Blot-Analyse das XT-I-Protein im Zellkulturüberstand durch OEK3-Antiserum,

einem monospezifischen polyklonalen Antiserum gegen ein XT-I-homologes Peptid, nachgewiesen (Abb. 28). Aufgrund der hohen Spezifität von Antikörpern ist aus diesem Ergebnis zu schließen, dass die XT-I mit Hilfe von OEK3-Antiserum detektiert wurde und dass in den XT-II-Klonen keine Kontamination oder Verschleppung von XT-I vorliegt.

Als Methode zur Quantifizierung der Genexpression auf RNA-Ebene wurde die *Real-Time* PCR am *LightCycler* verwendet. Als *Template* für die PCR diente durch Reverse Transkription mit *Oligo(dT)-Primern* erhaltene cDNA. Daher ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu beachten, dass vermutlich eine Basistranskription detektiert wird, die aufgrund der insektenzelleigenen Xylosyltransferase entsteht. *High-Five*-Insektenzellen besitzen vermutlich wie *Drosophila* nur 1 Gen für eine Xylosyltransferase. Da die Primer für XT-I und XT-II auf der Grundlage der humanen Sequenz ermittelt wurden, war es zunächst fraglich, ob mit der Xylosyltransferase aus Insektenzellen mit den humanen Primern ein PCR-Produkt entsteht. Mit XT-I-spezifischen Primern konnte tatsächlich auch bei der Probe aus nicht-transfizierten Zellen ein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 32A), was vermutlich durch die sehr hohe Homologie der Xylosyltransferasen auch zwischen verschiedenen Spezies begründet ist. Die eindeutige Differenzierung gelang mit XT-II-spezifischen Primern, die mit der Probe aus nicht-transfizierten Zellen kein PCR-Produkt ergaben (Abb. 32B). Auch diese Ergebnisse bestätigten die vorherigen Western-Blot-Analysen und zeigten, dass die untersuchten stabilen XT-II-Klone spezifisch sind und das rekombinante Protein für Untersuchungen zur katalytischen Aktivität verwendet werden kann.

Da die humane XT-I mit hoher katalytischer Aktivität in den High-Five-Zellen exprimiert wird, bietet dieses Expressionssystem gute Voraussetzungen, um auch die humane XT-II in aktiver Form zu exprimieren. Obwohl die für die rekombinante XT-II erhaltene Proteinmenge deutlich geringer ist im Vergleich zur XT-I, sollte aufgrund der hohen Sensitivität des radiochemischen Aktivitätstests die Analyse und Aufklärung von Substrat und Akzeptor der XT-II möglich sein. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie [77] zwischen XT-I und XT-II ist zu vermuten, dass XT-II ebenso Xylose transferiert. Da der Akzeptor jedoch bisher völlig unbekannt ist, ergeben sich die verschiedensten Möglichkeiten. Dies könnte eine Consensus-Sequenz in einem Core-Protein sein, ein Xylose-Rest in einer Saccharidstruktur oder ein sonstiges Saccharid. In einer ersten Analyse im XT-Aktivitätstest mit UDP-[¹⁴C]Xylose als Substrat und potentiellen Akzeptoren konnte kein Xylosetransfer durch XT-II unter den gewählten Reaktionsbedingungen detektiert werden. Die Analyse des transferierten Zuckers durch XT-II könnte durch massenspektrometrische Verfahren vermutlich schneller aufgeklärt werden.

5.4 Analyse der XT aus *Prionace glauca*

Knorpelfische, wie z.B. Haie, stellen evolutionär eine sehr alte Spezies dar, und bieten sich daher für phylogenetische Untersuchungen sehr gut an. XT-I ist das initiale Enzym für den Aufbau der Proteoglykane, die den Hauptbestandteil von Knorpel darstellen. Daher könnte die XT aus einer stammesgeschichtlich alten Spezies sehr interessante Ergebnisse liefern, auch in Bezug des Auftretens von 2 Xylosyltransferasen bei verschiedenen Spezies, während andere nur 1 Gen für eine XT besitzen.

Für die Analyse der spezifischen Aktivität der Hai-XT wurde zunächst homogenisierter Hai-Knorpel im XT-Aktivitätstest mit den potentiellen Akzeptoren Seidenfibroin bzw. rekombinantes Bikunin eingesetzt. Obwohl Bikunin für die humane XT-I einen sehr guten Akzeptor darstellt [70], konnte mit dem Hai-Enzym keine messbare Aktivität detektiert werden. Dafür wurde mit Seidenfibroin als Akzeptor ein guter Transfer von Xylose beobachtet. Dieses interessante Ergebnis weist darauf hin, dass anscheinend nicht nur die Consensus-Sequenz für die Erkennung des Akzeptors notwendig ist, sondern dass vermutlich weitere Faktoren einen Einfluss besitzen, die bisher nicht bekannt sind.

Die Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur des Hai-Enzyms bei ca. 18 °C (Abb. 34) beruht wohl auf der Grundlage, dass Haie wechselwarme Tiere sind und ihre Körpertemperatur daher der Umgebungstemperatur anpassen. Ihr Lebensraum sind Gewässer, die selten eine Temperatur über 21°C besitzen, und daher ist ein Temperaturbereich unter 18°C für die volle katalytische Aktivität des Enzyms auch notwendig. Dagegen besitzt die humane XT-I ihr Optimum bei 37°C, verliert aber andererseits in einem breiten Temperaturbereich von 18 – 43°C nicht vollständig die Aktivität, sondern zeigt nur einen moderaten Verlust an enzymatischer Katalyse auf.

Ein sehr interessantes Ergebnis liefert die Analyse des potentiellen Inhibitors Heparin. Die Hai-XT zeigt auch mit steigenden Heparin-Konzentrationen kaum einen Verlust in der Aktivität, während im Vergleich zur humanen XT-I schon sehr geringe Mengen für eine vollständige Inhibition ausreichen. Könnte die cDNA des Hai-Enzyms kloniert werden, so wäre eine gute Möglichkeit für die Analyse der Heparinbindungsregion in der humanen XT-I eröffnet.

Diese wenigen Analysen mit dem Hai-Enzym der XT haben bereits gezeigt, dass durch den Vergleich mit der humanen XT-I wichtige Hinweise und weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Struktur und Bindungseigenschaften ermittelt werden könnten. Die Klonierung der Hai-XT und die rekombinante Expression dieses Proteins stellt einen

wichtigen Aspekt für die weitere Analyse dar. Bisherige Versuche sind an der Amplifikation der XT aus cDNA gescheitert, da es sich bei der mRNA um ein eher seltenes Transkript handelt, was daher nur in geringer Konzentration vorliegt. Weiterhin hat sich das Primerdesign als sehr diffizil erwiesen, da auch Primer aus hoch-homologen Regionen kein Amplifikat ergaben. Dies ist jedoch auch als Hinweis zu werten, dass die Sequenz der Hai-XT über wesentlich geringere Homologien mit den humanen Enzymen verfügt wie ursprünglich angenommen wurde.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die für die katalytische Aktivität essentiellen Cystein-Reste der XT-I identifiziert. Eine Eingrenzung der N-terminal notwendigen Aminosäuren konnte durch die Klonierung von Deletionsmutanten erfolgen und zeigt, dass der Aminoterminus keine direkte Funktion für die katalytische Aktivität der XT-I besitzt. Da bisher noch nicht geklärt werden konnte, wo die Erkennungssequenz innerhalb der Stamm-Region für eine potentielle Protease lokalisiert ist, die *in vivo* der Freisetzung der löslichen Form der XT-I dient, wären aufgrund der vorliegenden Ergebnisse hier weitere Untersuchungen notwendig. Die Erkennungssequenz ist vermutlich innerhalb der hochvariablen N-terminalen Region des Proteins lokalisiert, wobei die geringe Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Spezies die Identifizierung der Spaltstelle eher erschwert.

Im Gegensatz zu anderen Glykosyltransferasen besitzt die humane XT-I mit ca. 100 kDa ein sehr hohes Molekulargewicht. Weiterhin sind die meisten Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat lokalisiert, während die XT-I in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Das außergewöhnlich hohe Molekulargewicht und die aktive Sezernierung lassen vermuten, dass es sich bei der XT-I um ein multifunktionelles Enzym handelt. Denkbar ist dabei, dass durch die Anlagerung der XT-I an das *Core*-Protein eine Struktur entsteht, die erst die Bindung weiterer Glykosyltransferase und damit die Übertragung der folgenden Zucker ermöglicht. Untersuchungen zur Komplexbildung und Wechselwirkung zwischen den beteiligten Glykosyltransferasen könnten Aufschluss darüber geben.

Ein wichtiges Ziel für die Aufklärung der Funktion der XT-I liegt in der Kristallisation des Enzyms. Notwendige Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die XT-I in hoher Konzentration und sehr hoher Reinheit vorliegt. Die rekombinante Expression ermöglicht die Synthese von großen Proteinmengen, als problematisch hat sich jedoch die Einstellung der gewünschten Proteinkonzentration erwiesen. Hier muss eine Möglichkeit

gefunden werden, um die XT-I auch bei höheren Konzentrationen in Lösung zu behalten. Ein denkbares Vorgehen könnte darin bestehen, dass man nicht das Enzym allein für die Kristallisation verwendet, sondern es im Komplex zusammen mit Substrat oder Akzeptor kristallisiert. Eine Röntgenstrukturanalyse würde vielfältige Fragen beantworten und zur Aufklärung des Katalysemechanismus der XT-I beitragen.

Durch die Etablierung eines Testsystems zur relativen Quantifizierung der Genexpression der XT-I und XT-II ist die Voraussetzung geschaffen, die Involvierung der beiden Xylosyltransferasen an einer Vielzahl von physiologischen sowie pathophysiologischen Prozessen zu analysieren. Die Aufgabe weiterer Untersuchungen könnte z.B. in der Analyse der Genexpression bei der Follikulogenese oder bei Patienten mit systemischer Sklerodermie sein. Auch die Analyse von Herzgewebeproben bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) hat bereits gezeigt, dass eine gesteigerte Genexpression beider Xylosyltransferasen nachweisbar ist. Da die DCM mit einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix korreliert, könnte diese Methode zur Analyse und Detektion von Pathomechanismen der komplexen Umbauprozesse eingesetzt werden.

Bei der Kultivierung von JAR-Zellen konnte ein proliferationsabhängiges Expressionsmuster der XT-I und XT-II beobachtet werden, was für eine diagnostische Beurteilung der DCM verwendet werden könnte. Nach ersten Ergebnissen könnte XT-II an der *De novo*-Synthese von Proteoglykanen beteiligt sein, wogegen die Genexpression der XT-I bei Umbauprozessen der extrazellulären Matrix hochreguliert wird. Eine qualitative Aussage über den Prozess struktureller Veränderungen im Herzgewebe könnte daher über einen Quotienten aus den relativen Genexpressionen beider Enzyme gebildet werden. Für die Etablierung einer solchen Systems wären jedoch zunächst umfangreiche Patientenkollektive zu untersuchen. In Rahmen von Zellkulturanalysen könnte der Einfluß von Medikamenten, Wachstumsfaktoren oder Hormonen auf die Expressionsstabilität und auf die Regulation der Xylosyltransferasen untersucht werden.

6. Methoden

6.1. Molekularbiologische Methoden

6.1.1. Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele werden zur Auftrennung und Längenbestimmung von DNA-Fragmenten verwendet. Bei der Agarosegel-Elektrophorese wird die Trennwirkung aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld erzielt. Je größer ein DNA-Fragment ist, umso stärker wird es durch die Agarosematrix zurückgehalten. Für DNA-Fragmente größer 500 bp eignet sich eine Agarosekonzentration von 1 %.

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wird 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) durch Aufkochen gelöst, mit 15 µg Ethidiumbromid versetzt und in einem Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren der Gelmatrix wird die Gelkammer in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, vollständig mit TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm herausgezogen. Die aufzutragenden Proben werden zunächst mit 20 % Auftragspuffer (0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 60% Saccharose in H₂O) versehen, bevor sie in die Geltaschen pipettiert werden. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von ca. 16 V/cm² durchgeführt. In der Gelmatrix enthaltenes Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht auf einem UV-Transilluminator eine sichtbare Fluoreszenz (Extinktion: 302 nm, Emission: 590 nm) zu erzeugen.

6.1.2. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Zur Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten wird bei der Agarosegel-Elektrophorese ein DNA-Längenstandard zusätzlich zur Probe aufgetragen. Durch Vergleich der Wanderungsstrecke der Probe mit der Laufstrecke einzelner Fragmente des Längenstandards kann die Länge von DNA näherungsweise bestimmt werden.

DNA-Längenstandard	Fragmentgrößen [bp]
1 kb DNA-Leiter	12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

6.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Abschätzung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung kann durch den optischen Vergleich im Agarosegel mit einem Standard bekannter Konzentration erfolgen. Eine genaue Bestimmung liefert die Messung der Absorption bei 260 nm. Hierfür wird die Probe gegen den Leerwert (H₂O) in einer 10 mm dicken Quarzküvette gemessen. Zur Berechnung der DNA-Konzentration c wird der Meßwert mit dem Extinktionsfaktor f multipliziert, wobei für doppelsträngige DNA $f = 50$ ist.

$$c = E_{260\text{nm}} \times f \text{ [mg/l]}$$

6.1.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet [98]. Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten, die 25 bis 35 Zyklen hintereinander durchgeführt werden:

- a) Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
- b) *Annealing* der Primer an einzelsträngige DNA
- c) Amplifikation durch eine thermostabile Polymerase

Ein typischer Reaktionsansatz zur Synthese von DNA-Fragmenten mittels PCR sieht wie folgt aus:

- 2,0 - 3,0 µl Template-DNA (Plasmid-DNA, genomische DNA)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer (250 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,)
- 1,0 µl *Forward*-Primer (25 µM)
- 1,0 µl *Reverse*-Primer (25 µM)
- 0,5 µl dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 50 µl Wasser

Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* besitzt die Eigenschaft der „Nicht-Matrizen-abhängigen Polymerisationsaktivität“ [99], durch die an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenin-Nukleotid angehängt wird. Dieser Effekt wird zur effizienten Klonierung von PCR-Produkten in Plasmidvektoren verwendet.

6.1.4.1. PCR-Temperaturzyklen

a) Standardprotokoll

Zyklen	Denaturierung		<i>Annealing</i>		<i>Extension</i>	
1x	94 °C	60 s				
30x	94 °C	60 s	50-55 °C	60 s	72 °C	2 min
1x	72 °C	15 min	als finaler Extensionsschritt			

b) für die Amplifikation von DNA mit degenerierten Primern

Zyklen	Denaturierung		<i>Annealing</i>		<i>Extension</i>	
1x	94 °C	60 s				
35x	94 °C	60 s	48 °C	60 s	72 °C	2 min
1x	72 °C	15 min	als finaler Extensionsschritt			

c) für die Amplifikation von DNA aus Hefezellen

Zyklen	Denaturierung		<i>Annealing</i>		<i>Extension</i>	
1x	94 °C	60 s				
44x	94 °C	60 s	50 °C	60 s	72 °C	3 min
1x	72 °C	15 min	als finaler Extensionsschritt			

6.1.4.2. Primersequenzen

Primer für die Amplifikation von aminoterminal verkürzten cDNA Fragmenten:

Primer	Oligonukleotid Sequenz
XT1Hind167U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA CCA CCG AGT - 3'
XT1Hind244U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA GGT GAG GTG - 3'
XT1Hind385U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA GGC AAG GAG - 3'
XT1Hind403U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA GCC CTG TCC - 3'
XT1Hind421U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA TCC AAG CAC - 3'
XT1Hind424U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA AAG CAC TGC - 3'
XT1Hind427U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA CAC TGC CGC - 3'
XT1Hind472U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA GGG CTG CTG - 3'
XT1Hind1309U	5' - GAT GAG GCA AGC TTA GTG GAC TGG - 3'
XT1Eco2025L	5' - GTG TGT GAA TTC GGC AGT GGA - 3'

Primer für die Amplifikation von carboxyterminal verkürzten cDNA Fragmenten:

Primer	Oligonukleotid Sequenz
XT1Xba2136L	5' - G ACT ACG TCT AGA GAA GGT CAG - 3'
XT1Xba2277L	5' - G ACT ACG TCT AGA TGC CTG TTC - 3'
XT1Xba2415L	5' - G ACT ACG TCT AGA GGC CGT CTG - 3'
XT1Eco2005U	5' - TCC ACT GCC GAA TTC ACA CAC - 3'

6.1.5. Real-Time PCR am LightCycler

Bei der *Real-Time* PCR finden Amplifikation und Detektion eines PCR-Produktes parallel statt. Die Detektion kann dabei mit verschiedenen Sonden erfolgen, wie z.B. Hybridisierungssonden oder *SYBR Green*, welche an dsDNA anlagert. Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Detektion und Quantifizierung von Amplifikaten sequenzspezifische Hybridisierungssonden verwendet.

Das Verfahren basiert auf zwei Oligonukleotid-Primern (Sonden), die mit jeweils einem unterschiedlichen Farbstoff markiert sind. Die Sequenzen werden dabei so gewählt, dass die Primer in direkter Nachbarschaft hybridisieren (Abb. 39). Dies ermöglicht zwischen dem 5'-Donor Fluorophor und dem 3'-Akzeptor-Fluorophor einen Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (engl. *Fluorescence resonance energy transfer*; FRET). Es wird als Donor-Fluorophor 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) und als Akzeptor-Fluorophor *LightCycler Red 640* (LC Red 640) verwendet. Über eine Anregung von FAM und dessen Emission bei 470 nm kommt es zu einem FRET und damit zur Anregung von LC RED 640, dessen Emission bei 640 nm photometrisch detektiert wird.

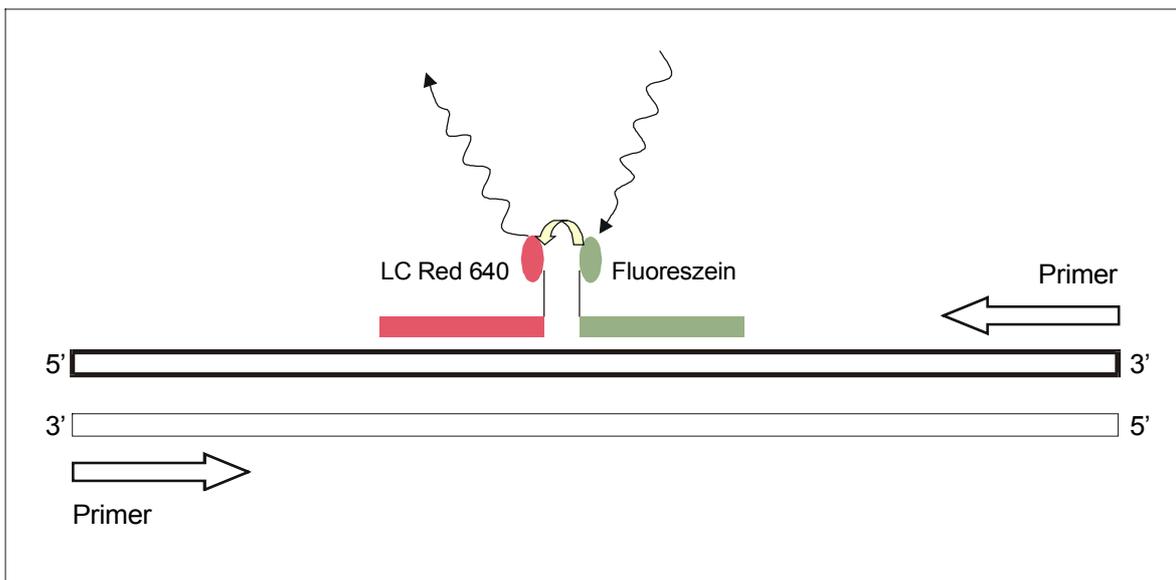


Abb. 39: Schematische Darstellung der Sondenhybridisierung.

Mit den entstandenen PCR-Produkten kann eine Schmelzkurvenanalytik durchgeführt werden, welche die Differenzierung zwischen verschiedenen Amplifikaten erlaubt. In dieser Arbeit wird die Schmelzkurvenanalytik verwendet, um im Falle der Xylosyltransferasen zwischen XT-I und XT-II differenzieren zu können.

Standard *Real-Time* PCR-Ansatz:

2,0 µl Template
 2,0 µl 10x Puffer (1,5 mM)
 1,2 µl MgCl (25 mM)
 0,5 µl *Forward*-Primer (25 µM)
 0,5 µl *Reverse*-Primer (25 µM)
 0,5 µl nicht acetyliertes BSA
 0,28 µl Donor-Sonde (25 µM)
 0,35 µl Akzeptor-Sonde (20 µM)
 0,25 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 25 mM)
 0,25 µl HotStar *Taq* DNA-Polymerase
 ad 20 µl Wasser

Standard *Real-Time* PCR-Protokoll:

Zyklen	Denaturierung		<i>Annealing</i>		<i>Extension</i>	
1x	95 °C	10 min				
35x	95 °C	2 s	55 °C	12 s	72 °C	10 s

Die Verwendung von Glaskapillaren mit einem günstigen Oberflächen-Volumenverhältnis ermöglichen wesentlich schnellere Temperaturübertragungen auf das Reaktionsgefäß als im Vergleich zu einer Thermoblock-PCR. Es wird ein *LightCycler* System der Firma Roche verwendet.

6.1.5.1. Sonden und Primer

Primer	Oligonukleotid Sequenz
XTI1200U	5' - CCATACGGTCCTGGAG - 3'
XTI1434L	5' - CCCAATGATTCCTGATTCAC - 3'
XTII_1464U	5' - TGGACAACAACCTGCG - 3'
XTII_1649L	5' - CCTCCTGGTTCACAGT - 3'

Verwendete Sonden:

XTIAnch1279: 5' - CTGGGCTGCAAGTGCCAGT [6~FAM~Q] - 3'

XTISens1300: 5' - LCRed-640-AAGCACATCGTGGACTGGT-Pho - 3'

6.1.5.2. *Real-Time Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) am LightCycler*

Für die Quantifizierung von RNA wird das Verfahren der *Real-Time* RT-PCR eingesetzt. Hierbei wird zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase die RNA in komplementäre DNA transkribiert, anschließend erfolgt die DNA-Amplifikation in dem gleichen Reaktionsgefäß unter Verwendung einer Ein-Schritt-RT-PCR (engl. *one step* RT-PCR). Für quantitative Genexpressionsanalysen beinhaltet diese Form der RT-PCR im Vergleich zu einer separaten reversen Transkription und DNA-Amplifikation weniger Fehlerquellen.

Standard RT-PCR Ansatz:

5,0 µl RNA
 10,0 µl 2x *Reaction* Puffer (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je
 0,4 mM und 2,4 mM MgSO₄)
 1,3 µl MgSO₄ (50 mM)
 0,5 µl *Forward*-Primer (25 µM)
 0,5 µl *Reverse*-Primer (25 µM)
 0,5 µl nicht acetyliertes BSA
 0,2 µl Akzeptor Sonde (20 µM)
 0,16 µl Donor Sonde (25 mM)
 0,6 µl Superscript Platinum *Taq*
 ad 20 µl Wasser

Standard RT-PCR Protokoll:

Zyklenzahl	RT	Denaturierung	<i>Annealing</i>	<i>Extension</i>
1	50 °C 10 min			
1		95 °C 2 min		
45		95 °C 2 s	55 °C 12 s	72 °C 10 s

6.1.6. *Site-directed* mutagenesis

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Herstellung von Cystein-Substitutionsmutanten der humanen XT-I, um die Bedeutung der Cystein-Reste für die Funktionalität des Enzymes und die Ausbildung von Disulfidbrücken analysieren zu können. Die rekombinante lösliche Form der humanen XT-I besitzt 14 Cystein-Reste, die individuell durch das ungeladene Alanin substituiert werden sollten. Um dies zu erreichen, werden die Codons der cDNA, die für die konservierten Cysteine codieren, durch gerichtete Mutagenese verändert. Zur Mutation von Cystein zu Alanin war überwiegend nur der Austausch von zwei Basen notwendig. Die Primer mit dem jeweiligen Basentriplett sind unter Punkt 6.1.6.1. dargestellt.

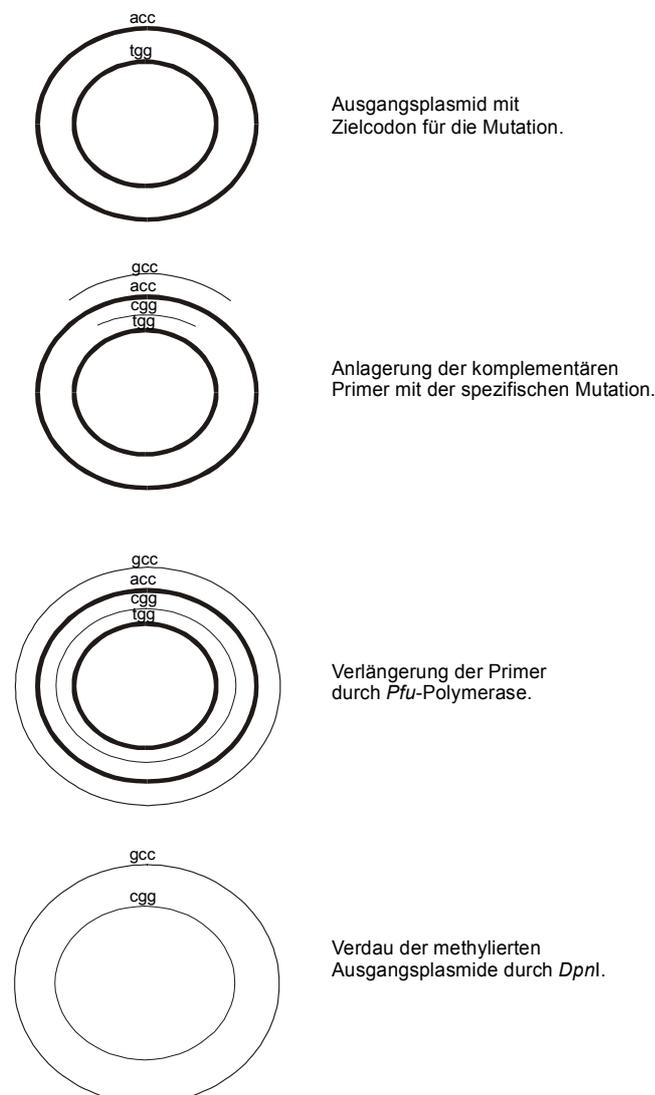


Abb. 40: Schematische Darstellung der Mutagenese.

Zur Mutagenese des Ausgangsplasmids pCG255 Δ 1-148XT-I wird das *QuickChange Site directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet. Bei dieser Methode wird in ein zirkuläres Plasmid eine Mutation eingefügt, indem es mit zwei komplementären Oligonukleotidprimern durch PCR amplifiziert wird. Diese komplementären Primer tragen die gewünschte Mutation, wodurch jede erzeugte Kopie des Plasmids diese ebenso enthält. Die Abtrennung von nicht mutierter parentaler-DNA erfolgt durch das Restriktionsenzym *DpnI*, welches ausschließlich methylierte DNA erkennt und spaltet. Die gewonnenen Plasmide sind ungeschlossene DNA-Ringe, sogenannte *nicked circles*, die nach der Transformation von Enzymen der Bakterienzelle ligiert werden.

6.1.6.1. Primer für *in vitro* mutagenese

Primer für die gerichtete Mutagenese der Cys-Reste: Cys → Ala

Primer	Oligonukleotid Sequenz	Mutation
C_XT1U356	5'- AT GAC CAG CCC CCT AAG GCT GAC ATC TCA G-3'	p.C257A
C_XT1L386	5'- TA CTG GTC GGG GGA TTC CGA CTG TAG AGT C-3'	p.C257A
C_XT1U416	5'- CT AAG TCC AAG CAC GCC CGC CAG GAG ATT G-3'	p.C276A
C_XT1L455	5'- GA TTC AGG TTC GTG CGG GCG GTC CTC TAA C-3'	p.C276A
C_XT1U443	5'- TT GGG GAG ACT TAC GCC CGC CAC AAG TTA G -3'	p.C285A
C_XT1L472	5'- AA CCC CTC TGA ATG CGG GCG GTG TTC AAT C-3'	p.C285A
C_XT1U493	5'- GTG ACT CGG TTC GCC CCC CTC GAG GGT AAA G-3'	p.C301A
C_XT1L523	5'- CAC TGA GCC AAG CGG GGG GAG CTC CCA TTT C-3'	p.C301A
C_XT1U998	5'- AT CGG CTC TTC CTG GAG GCC GAC GCT CAC-3'	p.C471A
C_XT1L1028	5'- TA GCC GAG AAG GAC CTC CGG CTG CGA GTG-3'	p.C471A
C_XT1U1212	5'- G GAG AAC AGC CCC CAC GCC GAC ACC ATG G-3'	p.C542A
CysXT1L1240	5'- C CTC TTG GCG GGG GTG CGG CTG TGG TAC C-3'	p.C542A
CysXT1U1270	5'- AAT CGC AAG CTG GGC GCC AAG TGC CAG TA-3'	p.C561A
CysXT1L1298	5'- TTA GCG TTC GAC CCG CGG TTC ACG GTC AT-3'	p.C561A
CysXT1U1277	5'- AG CTG GGC TGC AAG GCC CAG TAC AAG CAC A-3'	p.C563A
CysXT1L1306	5'- TC GAC CCG ACG TTC CGG GTC ATG TTC GTG T-3'	p.C563A
CysXT1U1305	5'- C ATC GTG GAC TGG GCC GGC TGC TCC CCC AA-3'	p.C572A
CysXT1L1334	5'- G TAG CAC CTG ACC CGG CCG ACG AGG GGG TT-3'	p.C572A
CysXT1U1310	5'- TG GAC TGG TGC GGC GCC TCC CCC AAT GAC T-3'	p.C574A
CysXT1L1339	5'- AC CTG ACC ACG CCG CGG AGG GGG TTA CTG A-3'	p.C574A

CysXT1U1611	5'- G GAT GGG GAG AAC AGC GCC CGA TAC TAC C-3'	p.C675A
CysXT1L1639	5'- C CTA CCC CTC TTG TCG CGG GCT ATG ATG G-3'	p.C675A
CysXT1U2341	5'-ATG TGG ACT GCC ATG GAC ATC GCT GCC ACG GG-3'	p.C920A
CysXT1L2372	5'-TAC ACC TGA CGG TAC CTG TAG CGA CGG TGC CC-3'	p.C920A
CysXT1U2367	5'- C ACG GGC CCC ACA GCC GCC CCG GTC ATG C-3'	p.C927A
CysXT1L2397	5'- G TGC CCG GGG TGT CGG CGG GGC CAG TAC G-3'	p.C927A
CysXT1U2383	5'- TG CCG GTC ATG CAG ACC GCC AGC CAG ACG-3'	p.C933A
CysXT1L2412	5'- AC GGC CAG TAC GTC TGG CGG TCG GTC TGC-3'	p.C933A

Primer für die gerichtete Mutagenese der drei potentiellen Glykosylierungsstellen der XT-I:
Asn → Gln

Primer	Oligonukleotid Sequenz
XT1ASN1U	5' - GA GCC GCA GCC CAA AGC AGC CAC GG - 3'
XT1ASN1L	5' - CT CGG CGT CGG GTT TCG TCG GTG CC - 3'
XT1ASN2U	5' - GA CTT CTT CAT CAA CCT GAG TGC GGC - 3'
XT1ASN2L	5' - CT GAA GAA GTA GTT GGA CTC ACG CCG - 3'
XT1ASN3U	5' - GG GGG AAG GGA CCT CAA GTG ACC GTG - 3'
XT1ANS3L	5' - CC CCC TTC CCT GGA GTT CAC TGG CAG - 3'

6.1.7. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten. Innerhalb der Gruppe der Endonukleasen gehören die meisten Enzyme zu den Typ II-Restriktionsendonukleasen, welche palindrome DNA-Sequenzen von meist 4 bis 8 bp erkennen. Die Effizienz der Spaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen und für jedes Restriktionsenzym unterschiedlich [100].

6.1.10. Nukleinsäureextraktion und –reinigung

6.1.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (*Escherichia coli*)

Das Verfahren zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen mit anschließender Fällung der genomischen DNA [102]. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann durch Bindung an eine Anionenaustauschermatrix isoliert werden [103].

Zur Isolierung von maximal 20 µg Plasmid-DNA wird das *QIAprep Spin Miniprep Kit* verwendet. Für die Präparation von bis zu 200 µg hochreiner Plasmid-DNA wird das *HiSpeed Plasmid Midi Kit* eingesetzt.

6.1.10.2. Isolierung von genomischer-DNA aus Hefezellen

Für die Isolierung von genomischer-DNA werden 10 – 30 mg Hefezellen zentrifugiert und 300 µl Lyse Puffer mit β-Mercaptoethanol zugegeben. Die Zerstörung der Zellwände erfolgt zusätzlich durch die Zugabe von Keramikkügelchen. Die Ansätze werden für 15 min bei 55°C inkubiert und anschließend im *Ribolyzer* 40 s homogenisiert. Die aufgeschlossenen Zellen können direkt für eine DNA-Isolierung mit dem kommerziellen *Dneasy Tissue Kit* eingesetzt werden. Die Isolierung wird nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Inkubation mit Proteinase K über Nacht erfolgt.

6.1.10.3. Extraktion von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen *NucleoSpin RNA II Kit* und basiert auf einer Säulenaффinitätschromatographie, bei der die RNA an Silikatverbindungen gebunden wird.

Gewebeproben werden unter permanenter Kühlung mit flüssigem Stickstoff unter sterilen, RNase freien Bedingungen aufgearbeitet. Es wird ein Lyse-Puffer mit 10% β-Mercaptoethanol zu den Zellen gegeben, die Suspension auf eine Filtersäule aufgetragen und durch Zentrifugation homogenisiert. Zu dem geklärten Lysat wird 70%iges Ethanol gegeben und die Präzipitatlösung auf eine Silikatsäule gegeben, an der die RNA bindet. Zum Entsalzen wird die Säule mehrfach gewaschen und anschließend wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Adhärenz wachsende Insektenzellen werden von der Oberfläche einer Zellkulturschale abgespült und zentrifugiert. Es wird ein Lyse-Puffer zu dem Zellpellet gegeben und die weitere Aufarbeitung erfolgt analog zu der Extraktion von RNA aus Gewebeproben.

6.1.11. RNA-Formamid-Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung einer RNA-Isolierung wird eine Agarosegelelektrophorese unter RNase-inhibierenden Bedingungen durchgeführt. Als Matrix wird ein 1,5%iges Agarosegel unter Standardbedingungen eingesetzt. Es werden je 2 µl RNA-Probe, 2 µl Formamid und 2 µl Auftragspuffer vermischt und anschließend bei 16 V/cm² aufgetrennt.

6.1.12. Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wird aus Zellen oder Geweben isolierte mRNA eingesetzt, die durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Als Oligonukleotidprimer dienen dabei entweder ein Oligo(dT)₁₅₋₁₈ Primer oder ein zur Zielsequenz komplementärer Primer.

Probenansatz:	1 – 5 µg	Gesamt-RNA oder mRNA
	0,5 µl	Primer (7 pmol)
	ad 12 µl	Wasser

Der Ansatz wird für 8 min bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

Pufferansatz:	4 µl	5x RT-Puffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , pH 8,3)
	2 µl	DTT (0,1 M)
	1 µl	dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	1 µl	RNase-Inhibitor (10 U)

Zu dem Probenansatz werden 8 µl des Pufferansatz gegeben und 3 min bei 42°C inkubiert. Danach wird 1 µl Superscript Reverse Transkriptase (200 U) zugegeben und der Ansatz für 90 min bei 42°C inkubiert. Nach erfolgter Denaturierung für 5 min bei 90°C kann die erhaltene cDNA für weitere Anwendungen eingesetzt werden.

6.1.13. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger [104] und erfolgt mit einem Kapillarelektrophorese-Sequenziergerät.

Bei dem verwendeten *Cycle Sequencing*-Verfahren zur DNA-Sequenzierung werden mehrere Syntheszyklen nacheinander durchgeführt, um eine lineare Anreicherung der verschiedenen langen Fluoreszenzmarkierten Produkte zu erreichen. Durch eine DNA-Polymerase erfolgt die DNA-Synthese, bis durch den Einbau eines 2',3'-Didesoxynukleotids die weitere Synthese abbricht. Die verwendeten Didesoxynukleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch die spezifischen Emissionsspektren nach Anregung durch Laserbestrahlung ist es möglich, alle Didesoxynukleotide in einem Ansatz zu detektieren. Die Detektion erfolgt durch Anregung mit einem Argon-Laser und Messung der Emission bei den für die Farbstoffe spezifischen Wellenlängen.

Für die Sequenzierreaktion wird folgender Ansatz verwendet:

- 6,0 µl Plasmid-DNA
- 1,5 µl Primer (2,5 µM)
- 4,0 µl Prämix-Sequenziergemisch (Puffer, MgCl₂, *Taq*-Polymerase)
- 8,5 µl HPLC-gereinigtes Wasser

Temperaturprofil:

Zyklen	Denaturierung		<i>Annealing</i>		<i>Extension</i>	
1x	94 °C	120 s				
25x	96 °C	10 s	48 °C	10 s	60 °C	240 s

Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgt durch eine Gelfiltration mit *Micro Bio-Spin* P-30 Säulen:

Die Säule wird mehrmals invertiert, um das Gel zu resuspendieren und Luftblasen zu entfernen. Die obere Kappe wird entfernt, die Spitze der Säule abgebrochen und in einem Reaktionsgefäß 2 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die gepackte Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, der Sequenzieransatz auf die Säule aufgetragen und für 4 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthält die aufgereinigte DNA die mit 20 µl HPLC-gereinigtem Wasser verdünnt wird. Nach 2 min Denaturierung bei 94°C kann der Ansatz für die Analyse eingesetzt werden.

6.2. Proteinchemische Methoden

6.2.1. Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität

Zur Quantifizierung der XT-I-Aktivität in Lösungen wird die Xylosylierung eines Akzeptorproteins durch die XT-I radiochemisch detektiert. Die Menge der eingebauten, radioaktiv markierten Xylose ist dabei proportional zur Enzymaktivität.

6.2.1.1. Präparation des Akzeptors Seidenfibroin

Das im XT-Test als Substrat eingesetzte Seidenfibroin des Seidenspinners *Bombyx mori* besitzt die repetitive Sequenz (GSGAGA)_n [105]. Seide lässt sich durch die Behandlung mit Lithiumthiocyanat in Lösung bringen und wird so in eine für die Xylosylierung geeignete Form überführt [68]. Das Seidenpräparat wird entsprechend der beschriebenen Methode in Lithiumthiocyanat solvatisiert. Die Lösung wird anschließend 72 h gegen Wasser dialysiert und danach mit 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 äquilibriert.

6.2.1.2. Radioaktiver Enzym-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Xylosyltransferase I-Aktivität in Zellkulturüberständen werden 50 µl Probe und 50 µl Substratreagenz gemischt und der Ansatz für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 90 µl des Reaktionsansatzes auf Nitrozellulosemembranen (Durchmesser 25 mm) pipettiert und 2 h bei RT getrocknet. Die Membranen werden in Szintillationsgefäße überführt und nach folgendem Protokoll gewaschen:

- 10 min mit je 3 ml 10%iger Trichloressigsäure
- 15 min mit je 3 ml 5%iger Trichloressigsäure
- 10 min mit je 4 ml 5%iger Trichloressigsäure
- 15 min mit je 3 ml 5%iger Trichloressigsäure

Das Protein auf den Membranfiltern wird durch 10%ige Trichloressigsäurelösung präzipitiert und nichtgebundene UDP-[¹⁴C]Xylose durch Waschen mit 5%iger Trichloressigsäure entfernt.

Die gewaschene Membran wird in 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgelöst und die Radioaktivität nach 12 h Inkubation bei RT im Szintillationszähler gemessen.

Substratreagenz:	1 μ M	UDP-[¹⁴ C]Xylose
	0,6 %	solvatisiertes Seidenfibroin
	50 mM	KCl
	10 mM	KF
	10 mM	MnCl ₂
	10 mM	MgCl ₂
	50 mM	4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl (MES), pH 6,5

6.2.1.3. Radioaktiver Aktivitätstest in Gegenwart von Effektoren

Für die Bestimmung des Einflusses von Glykosaminoglykanen und verschiedener Effektoren auf die XT-I Aktivität wird der radioaktive XT-Test modifiziert. Als Akzeptor wird anstatt Seidenfibroin 1,5 μ M rekombinantes Bikunin eingesetzt. Es werden kommerziell erhältliche Präparationen von Heparin, Chondroitin-6-Sulfat, Heparan Sulfat und UDP der Enzym-Probe zugesetzt und 5 min bei RT inkubiert, bevor das Substratreagenz zugegeben wird.

6.2.1.4. Bestimmung der Akzeptoreigenschaften von Peptiden und Proteinen

Die Bestimmung der Einbaurrate von radioaktiv markierter Xylose in unterschiedliche Akzeptorsubstrate der XT-I und XT-II erfolgt nach der oben beschriebenen Methode. Im Substratreagenz werden anstelle von solvatisiertem Seidenfibroin unterschiedliche potentielle Akzeptoren eingesetzt. Das weitere Vorgehen entspricht dem beschriebenen radioaktiven Aktivitätstest (siehe 6.2.1.2.).

6.2.2. Bestimmung des Proteingehalts in Zellkulturüberstand

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem Bicinchoninsäure-(BCA)-Proteinassay nach Pierce [106].

Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine in alkalischer Lösung. 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin (*Bicinchoninic acid*) ist ein für Cu(I) spezifisches chromogenes Reagenz, dessen Umsetzung photometrisch bei 562 nm quantifiziert werden kann. Zur Eichung wird eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin-Lösung (0-1000 mg/ml) verwendet. Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben.

6.2.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) ist ein anionisches Detergens, das fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen überdeckt, so daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen [107]. Zur Auflösung der Sekundär- sowie Tertiärstruktur werden die Proben mit SDS erhitzt. Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgt durch Thiolverbindungen wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol.

Für die SDS-PAGE werden vorgefertigte Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) in einem Bis-Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Als denaturierender Laufpuffer dient MOPS mit SDS-Zusatz. Die Proben werden mit SDS-haltigem Probenpuffer und 0,5 M DTT für 10 min auf 70°C erhitzt. Um die Größenordnung der Proteine abschätzen zu können, werden 5 μ l eines Proteinstandards aufgetragen.

Das Gel wird in der Elektrophoresekammer befestigt, 200 ml MOPS-SDS Laufpuffer (20 fach verdünnt) mit 500 μ l NuPAGE Antioxidanz in die innere Pufferkammer eingefüllt und die Taschen mit einer Spritze gespült. Die Proben werden aufgetragen und die äußere Pufferkammer mit 800 ml MOPS-SDS Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese wird für ca. 90 min bei 120 V und 50 mA durchgeführt.

Laufpuffer (20x):	104,6 g	MOPS
	60,6 g	Tris
	10,0 g	SDS
	3,0 g	EDTA
	mit Wasser auf 500 ml auffüllen	
	pH-Wert des Puffers auf 7,7 einstellen	

Probenpuffer (4x):	4,0 g	Sucrose
	0,68 g	Tris
	0,67 g	Tris-HCl, pH 8,5
	0,80 g	SDS
	6,0 mg	EDTA
	750 μ l	Serva Blau G250 (1 %)
	250 μ l	Phenol Rot (1 %)
	mit Wasser auf 10 ml auffüllen	

See Blue Pre-Stained Standard:

Standardproteine	Größe [kDa]
Myosin	191
BSA	64
Glutamat-Dehydrogenase	51
Alkohol-Dehydrogenase	39
Carboanhydrase	28
Myoglobin	19
Lysozym	14
Aprotinin	6,0
Insulin (B-Kette)	3,5

Mark12 Wide Range Protein Standard:

Standardprotein	Größe [kDa]
Myosin	200,0
β -Galactosidase	116,3
Phosphorylase B	97,4
BSA	66,3
Glutamat-Dehydrogenase	55,4
Lactat-Dehydrogenase	36,5
Carboanhydrase	31,0
Trypsininhibitor	21,5
Lysozym	14,4
Aprotinin	6,0
Insulin (B-Kette)	3,5
Insulin (A-Kette)	2,5

6.2.4. Chromatographische Techniken

6.2.4.1. Gelfiltration

Für die chromatographische Auftrennung von Proteinen und die Entsalzung von Proteinlösungen wird eine TSK G3000 SW Gelfiltrationssäule mit 300 mm Länge und 75 mm Innendurchmesser verwendet. Als mobile Phase dienen 25 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0 mit 150 mM Natriumchlorid. Die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase beträgt zwischen 1,0 ml/min bis zu 5,0 ml/min. Als Probe werden bis zu 5 ml sterilfiltrierte Proteinlösung mit einem Proteingehalt von unter 2,0 mg/ml aufgegeben. Die Chromatographie erfolgt bei RT, wobei die Absorption bei 220 nm und bei 280 nm, der pH-Wert und die Konduktivität der mobilen Phase gemessen und aufgezeichnet werden.

6.2.4.2. Ni²⁺-Chelat Affinitätschromatographie

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* ist eine geeignete Methode, um große Mengen von einem Protein zu produzieren. Verwendet man für die Klonierung einen Expressionsvektor, der hinter dem *Insert* zusätzlich für sechs Histidine (His-Tag) kodiert, so wird dieser Hexahistidinrest fusioniert an das gewünschte Genprodukt exprimiert und eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Ni²⁺-NTA Agarose ist möglich.

Ein Ni²⁺-Ion wird von dem Chelatbildner Nitrilo-triacetat (NTA) gebunden, der vier Koordinationsstellen des Ions bindet. Dieser Komplex wird an eine Agarosematrix als immobile Phase gebunden. Über die verbleibenden zwei Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions können zwei His-Reste gebunden werden. Für eine effiziente Aufreinigung müssen mindestens sechs His-Reste an das zu isolierende Protein fusioniert werden, damit die hoch affine Bindung des aufzureinigenden Proteins gewährleistet ist.

Die Aufreinigung erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen *Probond Purification System* von Invitrogen nach Herstellerangaben unter nativen Bedingungen.

6.3. Immunologische Methoden

6.3.1. Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA ist sowohl eine enzymatische als auch immunochemische, sehr empfindliche und spezifische Analysenmethode, mit deren Hilfe u.a. die Bestimmung von Antigenen, Antikörpern und Haptenen im Nanogramm-Bereich möglich ist.

Enzymimmunoassays beruhen auf der Verwendung von Enzymen und den entsprechenden Substraten als Detektionssystem. Die quantitative Bestimmung wird durch das Produkt der enzymatischen Reaktion ermöglicht, das als Indikator für den Ablauf der Reaktion dient.

6.3.1.2. Chloramphenicol Acetyltransferase-ELISA

Die Methode des CAT-ELISA dient zur Bestimmung der Chloramphenicol Acetyltransferase Konzentration im Zellkulturüberstand.

Es werden mit *Anti*-CAT-beschichtete, kommerziell erhältliche Mikrotiterplatten verwendet. 200 µl Zellkulturüberstand werden pro Vertiefung vorgelegt. Nach 1stündiger Inkubation bei 37 °C wird fünfmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden pro Vertiefung 200 µl anti-CAT-DIG (2 mg/ml) zugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Man wäscht fünfmal mit 250 µl Waschpuffer und gibt in jede Vertiefung 200 µl anti-DIG-POD (150 mU/ml) und inkubiert 1 h bei 37 °C. Es wird fünfmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und pro Vertiefung 200 µl POD-Substrat hinzugefügt. Nach 10-30 min Inkubation wird die Absorption bei 405 nm im ELISA-Platten-Photometer gemessen.

CAT enzyme stock solution (103 ng/ml)
anti-CAT-DIG (0,2 mg/ml)
anti-DIG-POD (20 U/ml)
POD-Substrat
Waschpuffer (10x)
Probenpuffer

6.3.2. Dot-Blot-ELISA auf PVDF-Membran

Als schneller Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion eignet sich der *Dot-Blot-ELISA*. Diese Methode erlaubt die rasche Fixierung aller Proteine einer Lösung zur weiteren Detektion mit spezifischen Antikörpern. Dazu werden das Antigen, Zellkulturüberstand und Kontrollen auf einer PVDF-Membran immobilisiert [108]. Anschließend kann ein gegen das Antigen gerichteter Primärantikörper an das immobilisierte Protein binden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung eines spezifischen peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpers. Durch die Peroxidase, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt, kann die Reaktion detektiert werden.

6.3.3. Detektion immobilisierter Proteine mit *Anti-V5-HRP*

Das Verfahren entspricht dem oben beschriebenen *Dot-Blot* auf PVDF-Membran mit dem Unterschied, daß ein direkt mit Peroxidase markierter Antikörper (*Anti-V5-HRP* 0,7 mg/ml) eingesetzt wird. Der immunologische Proteinnachweis erfolgt hier mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen das auf dem pMIB/V5-His-A Vektor codierte C-terminale V5-Epitop (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr), welches als Fusionsprotein exprimiert wird.

6.3.4. Western-Blot

Nach der SDS-PAGE können die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf einer Membran mittels der *Semidry-Blot*-Technik immobilisiert werden [109]. Dabei werden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch in einer Halbtrockenzelle (Blotkammer) auf eine PVDF-Membran übertragen, wobei das Bandenmuster der Auftrennung erhalten bleibt. Die Detektion der auf der Membran immobilisierten Proteine erfolgt mittels Immunofärbung.

6.4. Zellkultur

6.4.1. Kultivierung von Bakterien (*Escherichia coli*)

6.4.1.1. Anzucht von *Escherichia coli* in Flüssigkultur und auf Festmedien

Für die Vermehrung von *E.coli* werden zwischen 5 – 50 ml LB-Medium (1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt) [110] verwendet. Bei Ampicillin resistenten Stämmen werden 50-150 µg/ml Ampicillin zugesetzt, bei Zeocin Resistenz werden 250 µg/ml Antibiotikum zugefügt. Das Medium wird mit Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei der Anzucht auf Festmedien wird LB-Medium mit 2% Agar verwendet, hierbei wird eine Zellsuspension auf einer Agarplatte verteilt und für 20-48 h bei 37°C inkubiert.

6.4.1.2. Konservierung von *Escherichia coli*

Sollen Bakterien über einen längeren Zeitraum revitalisierbar gelagert werden, so werden diese bei -80 °C als Glycerinkultur eingefroren. Hierfür wird Zellmaterial mit einer Impföse von der Agarplatte entnommen, in Gefriermedium (20 % Glycerin in LB-Amp-Medium) resuspendiert und bei - 80 °C eingefroren.

6.4.1.3. Transformation von *TOP10*-Zellen

Für die Transformation werden kommerziell erhältliche chemisch kompetente *E.coli*-Zellen, Stamm TOP10, eingesetzt. Die bei -80 °C gelagerten Zellen werden auf Eis aufgetaut und 2 µl Ligationsansatz zugegeben. Der Ansatz wird 30 min auf Eis und 30 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und dann 250 µl S.O.C.-Medium zugefügt. Anschließend werden die Ansätze bei 37 °C für 1 h bei leichter Bewegung inkubiert. Die Bakterienkulturen werden auf LB-Platten ausplattiert, wobei die Selektion auf plasmidhaltige Zellen je nach verwendeten Vektor durch Zusatz von Ampicillin, Zeocin oder Kanamycin erfolgt.

S.O.C.-Medium [111]:

2,0 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glukose

6.4.1.4. Bakterielle Proteinexpression

Die bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen erfolgt in einer 250 ml Kultur mit LB-Medium, wobei eine Zelldichte bis zu einer OD_{560nm} von 1,5 bis 2 angezogen wird. Die Induktion der Proteinexpression wird durch die Zugabe von IPTG induziert und danach für einen Zeitraum von 4 h inkubiert. Die Zellmasse wird dann durch Zentrifugation abgetrennt und für die Isolierung des rekombinanten Proteins aus den *inclusion bodies* oder für die Aufreinigung verwendet.

6.4.2. Kultivierung von Hefezellen (*Pichia Pastoris*)

6.4.2.1. Anzucht von *Pichia Pastoris* in Flüssigkultur und auf Festmedien

Die Anzucht der Wirtsstämme *Pichia Pastoris* GS115, KM71H und X-33 erfolgt in einem Schikanenkolben in YPD-Vollmedium oder auf YPD-Agarplatten bei einer Inkubationstemperatur von 28°C. Zur Herstellung einer Großkultur werden 5 ml einer über Nacht Kultur in 500 ml YPD-Medium überimpft und weitere 24 h bei 28°C inkubiert. Die Generationszeit der Hefezellen liegt bei ca. 2 h.

YPD-Medium: 1% Hefeextrakt
 2% Pepton
 2% Dextrose
 für Festmedium wird 2% Agar zugegeben

6.4.2.2. Kryokonservierung von *Pichia Pastoris*

Für die Kryokonservierung von Hefezellen wird eine Kultur in 50 ml YPD-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 6-8 angezogen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml YPD-Medium mit 50% Glycerin resuspendiert und bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Nach längerer Lagerungsdauer sollten die Zellen auf den korrekten Genotyp getestet und gegebenenfalls neu selektiert werden.

6.4.2.3. Herstellung elektrokompetenter Hefezellen und Elektroporation

Es werden 5 ml YPD-Medium mit Hefezellen inokuliert und über Nacht bei $28^{\circ}C$ inkubiert. Mit dieser Vorkultur werden 500 ml frisches Medium angeimpft und die Zellen bis zu einer OD_{600nm} von 1,3 – 1,5 angezogen [112]. Die Zellen werden bei 1500 rpm, $4^{\circ}C$ für 5 min zentrifugiert und in 500 ml eiskaltem H_2O resuspendiert. Nach weiteren Zentrifugationen werden die Zellen zunächst in 250 ml H_2O und dann in 20 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Zellpellet in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen müssen vor jeder Transformation neu hergestellt werden.

Von den elektrokompetenten Zellen werden 80 μ l mit dem linearisierten Plasmid gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette luftblasenfrei pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 1500 V, 50 μ F und 200 Ω . Nach dem Impuls werden die Ansätze auf YPDS-Platten ausgestrichen.

YPDS-Medium:	1%	Hefeextrakt
	2%	Pepton
	2%	Dextrose
	1M	Sorbitol
		für Festmedium wird 2% Agar zugegeben

6.4.2.4. Herstellung chemisch-kompetenter Hefezellen und Transformation

Für die Herstellung von chemisch-kompetenten Hefezellen wird das kommerziell erhältliche *Pichia Easy comp Kit* von Invitrogen verwendet. Die Herstellung kompetenter Hefezellen und die Transformation erfolgt nach Herstellerangaben.

6.4.3. Kultivierung von Insektenzellen

6.4.3.1. Kulturmedien, Zusätze und Lösungen

Allen Medien werden 10 µg/ml Gentamycin zugefügt. Serumhaltiges Medium enthält 10% FCS. Im folgenden sind die benutzten Medien, Zusätze und die zugehörigen Zelllinien aufgeführt:

<i>Insect Xpress Medium</i>	<i>High-Five</i> Insektenzellen (Ovarzelllinie)
Sf-900 II SFM Medium	Sf9 Insektenzellen
<i>Grace's Medium Supplemented</i> incl. 10% FCS	<i>Mimic cells</i>

6.4.3.2. Kultivierung der verschiedenen Insektenzell-Linien

Die Insektenzellen werden in sterilen Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen kultiviert, deren Oberfläche adhärentes Wachstum der Zellen begünstigt. Die Kultivierung erfolgt bei 27°C ohne Zugabe von Kohlendioxid. Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilem Einwegmaterial durchgeführt.

Zur Vermehrung werden die Zellen einer Flasche auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Dazu werden 20 ml des Kulturmediums entfernt und mit den verbleibenden 10 ml Medium die Zellen von der Oberfläche abgespült. Es werden 1/5 der resuspendierten Zellsuspension in eine neue 175 cm²-Flasche mit 30 ml Medium gegeben und unter den o.g. Bedingungen kultiviert.

6.4.3.3. Kryokonservierung von Insektenzellen

Für die Konservierung von Zellkulturen über Zeiträume von mehreren Jahren werden Suspensionen aus ca. 80% bewachsenen Kulturflaschen hergestellt. Es werden je 500 µl Zellsuspension (Sollzellzahl der Suspension 0,5 – 1x10⁷ Zellen/ml) mit 500 µl kaltem Einfriermedium (30% FCS/10% DMSO) gemischt. Diese werden dann in Aluminiumblöcken und Styroporboxen langsam auf –80°C abgekühlt. Nach 24 h können die Proben in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

6.4.3.4. Bestimmung der Zellzahl

Aus einem Aliquot der Zellsuspension wird ein definiertes Volumen mit 0,2 %iger Trypanblau-Lösung gut gemischt. Die Lebendzellzahl kann unter einem Phasenkontrastmikroskop in einer Neubauerzählkammer bestimmt werden. Tote Zellen und Trümmer sind dunkel angefärbt. Die ermittelte Zahl ($\times 10^4$) entspricht der Zellzahl in 1 ml Suspension, wobei noch die Verdünnung zu berücksichtigen ist.

6.4.3.5. Transfektion von *High-Five*-Zellen mit *Cellfectin*

Zur Transfektion von *High-Five* Zellen mit *Cellfectin* werden 2×10^6 Zellen mit 3 ml *Insect Xpress* Medium in eine 60 mm Zellkulturschale gegeben und für 1 h bei RT inkubiert.

Ein typischer Transfektionsansatz wird wie folgt vorbereitet:

Lösung A:	100 μ l	<i>Insec Xpress</i> Medium (ohne Gentamycin)
	1-10 ng/ μ l	Plasmid-DNA
Lösung B:	100 μ l	<i>Insect-Xpress</i> Medium (ohne Gentamycin)
	1,5-9 μ l	<i>Cellfectin-Reagenz</i>

Beide Lösungen werden vereinigt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 800 μ l Medium zu den Ansätzen gegeben und vorsichtig gemischt. Von den Zellen wird das Medium abgezogen, die Ansätze gleichmäßig auf die Zellen getropft und für 4 h bei RT inkubiert, wobei alle 15 min jeder Ansatz leicht von Hand bewegt wird. Es werden 2 ml Medium zugefügt und die Ansätze bei 27 °C inkubiert. Die Proteinexpression wird nach 72 Stunden analysiert.

6.4.3.6. Selektion stabiler *High-Five*-Zellklone

Die Transfektion von *High-Five*-Zellen wird nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Die Selektion auf plasmidhaltige Zellen erfolgt durch Zugabe von Blasticidin S zum Kulturmedium.

48 h nach der Transfektion wird das Medium von den Ansätzen entfernt und durch 2 ml *Insect Xpress* Medium (ohne Blasticidin S) ersetzt. Die Zellen werden durch Abspülen abgelöst und resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit Medium (ohne Blasticidin S) aufgefüllt und wie folgt aufgeteilt:

- I. 2 ml Zellsuspension + 3 ml Medium (ohne Blasticidin S)
- II. 8 ml Zellsuspension

Nach 24 h Inkubation bei 27 °C wird von den Ansätzen das Medium abgezogen und 5 ml *Insect Xpress* Medium mit 80 µg/ml Blastocidin S zugegeben. Das Blastocidin S haltige Medium wird alle 5 Tage gewechselt.

6.4.3.7. Transfektion von *Mimic cells* mit *Cellfectin*

Zur Transfektion von *Mimic cells* mit *Cellfectin* werden 2×10^6 Zellen mit 3 ml *Grace's* Medium (*Supplemented*) in eine 60 mm Zellkulturschale gegeben und über Nacht bei 27°C inkubiert.

Transfektionsansatz:

1 ml	<i>Grace's</i> Medium (<i>Unsupplemented</i> , ohne Gentamycin und FCS)
1-10 ng/µl	Plasmid-DNA
3-10 µl	<i>Cellfectin-Reagenz</i>

Die Ansätze werden für 15 min bei RT inkubiert. Von den Zellen wird das Medium abgezogen und mit *Grace's* Medium (*Unsupplemented*) gewaschen. Die Ansätze werden gleichmäßig auf die Zellen getropft und für 4 h bei RT inkubiert, wobei alle 15 min jeder Ansatz leicht von Hand bewegt wird. Es werden 2 ml *Grace's* Medium (*Supplemented*, 10 % FCS) zugefügt und die Ansätze bei 27 °C inkubiert. Die Proteinexpression wird nach 72 Stunden analysiert.

6.4.4. Kultivierung humaner und tierischer Zellen

6.4.4.1. Kulturmedien und Zusätze

Allen Medien werden 100.000 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 0,25 mg/l Amphotericin zugegeben. Serumhaltiges Medium enthält 10% FCS. Im folgenden sind die benutzten Medien, Zusätze und die zugehörigen Zelltypen aufgeführt:

RPMI-1640 Chang Liver (human, Leberkarzinom), JAR (human, Plazenta Choriokarzinom), SW1353 (human, Chondrosarkom), CAPAN1 (human, Pankreas Adenokarzinom), CAPAN2 (human, Pankreas Adenokarzinom), HEK-293 (human, *embryonic kidney*)

Ham's F12 CHO-K1 (Chinesenhamster, Ovarzelllinie)

Bei den Zelllinien CAPAN1 und CAPAN2 werden dem Kulturmedium 18 bzw. 20% fötales Kälberserum zugefügt.

6.4.4.2. Kultivierung der verschiedenen eukaryontischen Zelllinien

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgt in sterilen Zellkulturflaschen bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid und 99% Luftfeuchtigkeit. Zur Vermehrung der Zellkulturen werden die Zellen einer Flasche auf mehrere aufgeteilt. Dazu wird das Medium entfernt, der adhärenzte Zellrasen mit PBS gewaschen und 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Die abgelösten Zellen werden in Medium aufgenommen, durch Zentrifugation pelletiert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl werden ca. $5 - 10 \times 10^5$ Zellen je 75 cm²-Flasche ausgesät.

7. Material und Geräte

7.1. Insektenzelllinien

High-Five, Trichoplusia ni, Ovarzelllinie Invitrogen, Groningen, NL

Sf9, *Spodoptera frugiperda*, Ovarzelllinie Invitrogen, Groningen, NL

Mimic cells, Spodoptera frugiperda,
transgene Ovarzelllinie Invitrogen, Groningen, NL

7.2. Humane und tierische Zelllinien

Chang Liver (human, Leberkarzinom) ICN Biomedicals, Meckenheim

CHO-K1 ATCC, Rockville, USA

JAR (human, Plazenta Choriokarzinom) ATCC, Rockville, USA

SW1353 (human, Chondrosarkom) ATCC, Rockville, USA

CAPAN1(human, Pankreas Adenokarzinom) ATCC, Rockville, USA

CAPAN2 (human, Pankreas Adenokarzinom), ATCC, Rockville, USA

HEK-293 (human, embryonic kidney) ICN Biomedicals, Meckenheim

7.3. Hefestamm *Pichia pastoris*

X-33 Invitrogen, Gronigen, NL

Genotyp: Wildtyp

GS115 Invitrogen, Groningen, NL

Genotyp: *his4*

Dieser Hefestamm eignet sich für die sekretorische Expression rekombinanter Proteine, die durch den Promotor der Alkoholoxidase (AOX) reguliert wird. Die Selektion der Transformanten wird durch *his4* ermöglicht, die die Histidinsynthese des Parentalstammes blockiert und erst durch Integration des Expressionsvektors wieder ermöglicht ist.

KM71H Invitrogen, Groningen, NL
 Genotyp: *aox1 :: ARG4 arg4*

7.4. Bakterienstämme

TOP10 Invitrogen, Groningen, NL
 Genotyp: *mcrA, Δ(mrr-hsdRMS.rcrBC), Δ80lacZ/M15, Δlac74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK⁻, rpsL, endA1, nupG*

Dieser Bakterienstamm wird zur Plamidpräparation verwendet. Die Aktivität endogener Restriktionsenzyme wird durch den Locus *hsdRMS* eliminiert.

BL21 (DE3) Novagen, Madison, USA
 Genotyp: *E.coli B F⁻ dcm Omp^T hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)*

Dieser Stamm eignet sich für Expressionsvektoren die über das T7-RNA-Polymerase-Operon verfügen (z.B. pET-Vektoren).

Im Genom dieses Stammes ist ein lysogener λDE3-Bakteriophage mit einem T7-RNA-Polymerase-Gen unter *lacUV5*-Promotor-Kontrolle integriert. Da die Insertion im Int-Gen liegt, kann der λ-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 Expression. Da dieser Stamm weder *lon*- noch *OmpT*-Proteinase produziert, ist die Degradation rekombinanter Proteine stark vermindert.

7.5. Vektoren

pCR2.1 Invitrogen, Groningen, Niederlande
 Der Vektor pCR2.1 wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet, die mit *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden. Der Vektor wird in linearisierter Form mit endständigen überhängenden T-Nukleotiden eingesetzt.

pMIB/V5-His-A

Invitrogen, Groningen, Niederlande

Der Vektor pMIB/V5-His-A ist ein Expressionsvektor zur maximierten Proteinexpression in Insektenzellen. Die Transkription wird durch den *OpIE2*-Promotor initiiert. Am aminoterminalen Ende des rekombinanten Proteins befindet sich das *Honeybee melittin secretion signal*, welches die Sekretion des Expressionsproduktes in den extrazellulären Raum steuert. Am carboxyterminalen Ende des Expressionsproduktes befinden sich das V5-Epitop, dieses kann zur Detektion des rekombinanten Proteins durch *Anti-V5*-Epitop Antikörper genutzt werden. Das ebenso C-terminal lokalisierte *6xHis*-Epitop kann zur erleichterten Aufreinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

pMIB/V5-His/CAT

Invitrogen, Groningen, Niederlande

Der Vektor pMIB/V5/CAT ermöglicht die Kontrolle der Expression. Er besitzt ein unter Kontrolle des *OpIE2*-Promotors gestelltes Chloramphenicol Acetyltransferase-Gen. Am aminoterminalen Ende des Expressionsproduktes befindet sich das *Honeybee melittin secretion signal* und am carboxyterminalen Ende das V5- und *6xHis*-Epitop.

pCG255 Δ 1-148 XT-I

Der rekombinante Vektor pCG255 Δ 1-148 XT-I besteht aus dem Expressionsvektor pMIB/V5-His-A ligiert mit einem DNA-Fragment der XT-I [78]. Bei Expression entsteht ein Fusionsprotein mit den beiden C-terminal lokalisierten Peptid-Epitopen V5 und *6xHis*, wodurch eine spezifische Detektion und Aufreinigung der Expressionsprodukte möglich ist.

7.6. Reagenziensätze

ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (DNA-Sequenzierung)	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Bicinchoninsäure-Proteinbestimmungssystem	Sigma, Deisenhofen
CAT-ELISA	Roche, Mannheim
Micro Bio-Spin Säulen (Aufreinigung von Sequenzierreaktionen)	Bio-Rad, München
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Plasmid Kit (Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>)	Qiagen, Hilden

QIAquick Spin Kit (Aufreinigung von PCR-Produkten)	Qiagen, Hilden
QIAHiSpeed Midi Kit (Isolierung hochreiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>)	Qiagen, Hilden
QIAExII Kit (Extraktion von DNA aus Agarosegelen)	Qiagen, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

7.7. Reagenzien

Antibiotika	Sigma, Deisenhofen
Antioxidanz für SDS-PAGE und <i>Western-Blot</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Anti-V5-Epitop-Antikörper, monoklonal Maus IgG2, gekoppelt an Meerrettichperoxidase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
bFGF	Bachem, Heidelberg
Bis-Tris-PAA-Gradientengele (4-12 %)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
BSA	Serva, Heidelberg
Cellfectin-Reagenz	Life Technologies, Eggenstein
4-Chloro-1-naphthol	Sigma, Deisenhofen
Coomassie R250	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco`s PBS	Sigma, Deisenhofen
DNA-Längenstandard 1 kB-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Insectin-Plus Liposomen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
IPTG	Life Technologies, Eggenstein
Kaninchen-Antiseren	BioScience, Göttingen
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Klenow Polymerase	AGS, Heidelberg
Laufpuffer für SDS-PAGE	Invitrogen, Groningen Niederlande
Mark12 Wide Range Protein Standard	Novex, Groningen, Niederlande
Methanol	Merck, Darmstadt

NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Peptide (OEK3, OEG1-3)	BioScience, Göttingen
Probenpuffer für SDS-PAGE	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
<i>Reducing Agent</i> für SDS-PAGE	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Restriktionsenzyme	AGS, Heidelberg Life Technologies, Eggenstein
Salzsäure	Merck, Darmstadt
<i>SeeBlue Pre-Stained</i> Protein Standard	Novex, Groningen, Niederlande
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, CA, USA
T4-DNA Ligase	AGS, Heidelberg
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Transferpuffer für Western-Blot	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
UDP-[¹⁴ C]Xylose	NEN DuPont, Dreieich
X-Gal	Life Technologies, Eggenstein
Ziege Anti-Maus IgG + IgM-Antikörper, polyklonal, gekoppelt an Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg

7.8. Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer ABI, Foster City, USA
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg, AGS, Heidelberg
Elektrophoresesystem <i>XCell II Mini-Cell</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
ELISA-Reader Dynatech MR 5.000	Dynatech, Guernsey, Channel Islands
LightCycler	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Renner, Darmstadt
pH-Meter Calimatic 761	Knick, Berlin
Photokamera	Polaroid, St. Albans, England
Schüttler <i>Celloshaker Variospeed</i>	Renner, Darmstadt
Spannungsgerät	Life Technologies, Eggenstein
Sterilbank Variolab W 90 (Klasse II)	Waldner, Wangen
Szintillationszähler LS5.000TD	Beckman Coulter, CA, USA
Temperaturbad	Julabo, Seelbach
Thermocycler	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
Vortex	Heidolph, Schwabach
Waage LG10-D	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau

7.9. Sonstige Materialien

Glasgeräte	Schott, Mainz
Mikrokonzentratoren	Millipore, Eschborn
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrocellulosemembran	Sartorius, Göttingen
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
Pipettenspitzen	Sarsted, Heidelberg
PVDF-Membran (Immobilon P)	Millipore, Eschborn
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zellkulturmaterial	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

8. Abkürzungen

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AK1	Primärantikörper
AK2	Enzymkonjugierter Sekundärantikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNA	Copy-DNA
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
Gal	Galactose
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M	Molar
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μU	Mikrounit
MES	2-(N-morpholin)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholin)-propansulfonsäure
n	Nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
T4	Bakteriophage T4
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat

U	<i>Unit</i>
U	Umdrehung
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt-XT-I	Rekombinante lösliche Form der humanen XT-I mit aminoterminal 148 deletierten Aminosäuren
xGal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
XT-I	Xylosyltransferase I
XT-II	Xylosyltransferase II
Xyl	Xylose
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Abkürzungen für Aminosäuren

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

9. Literatur

- [1] Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T. & Clausen, H. (1999) Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 35-53.
- [2] Paulson, J. C. & Colley, K. J. (1989) Glykosyltransferases. Structure, localization and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol. Chem.* **263**, 17615-17618.
- [3] Sadler, J. E., Biology of Carbohydrates. Ginsburg, V. and Robbins, P. W., eds, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons, 87-131 (1984).
- [4] Beyer, T. A., Sadler, J. E., Rearick, J. I., Paulson, J. C. and Hill, R. L. (1981) Glykosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **52**, 23-175.
- [5] Breton, C., Bettler, E., Joziassse. D. H., Geremia, R. A. and Imperty, A. (1998) JB review: sequence-function relationship of prokaryotic and aukaryotic Galactosyltransferases. *J. Biochem.* **123**, 1000-1009.
- [6] Paulsen, J., Colley, K. (1989) Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation, *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618.
- [7] Joziasses, D. H. (1992) Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure. *Glycobiology* **2**, 271-277.
- [8] Kapitonov, D. & Yu, R. K. (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**, 961-978.
- [9] Datta, A. K. & Paulson, J. C. (1995) The sialyltransferase „sialylmotif“ participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* **270**, 1497-1500.
- [10] Breton, C. & Imberty, A. (1999) Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 563-571.
- [11] Colley, K. J. (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13.
- [12] Kim, Y. S., Perdomo, J., Whitehead, J. S. & Curtis, K. J. (1972) Glykosyltransferases in human blood. II. Study of serum galactosyltransferase and N-acetylgalactosaminyltransferase in patients with liver deseases. *J. Clin. Invest.* **51**, 2033-2039.
- [13] Lammers, G. & Jamieson, J. C. (1989) Studies on the effect of lysosomotropic agents on the release of Gal- β 1-4GlcNAc α -2,6-sialytransferase from rat liver slices during the acute-phase response. *Biochem. J.* **261**, 389-393.
- [14] Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326** (Pt.3): 929-939.

- [15] Zhang, Z., Kochhar, S., Grigorov, M. (2003) Exploring the sequence-structure protein landscape in the glycosyltransferase family. *Protein Science* **12**, 2291-2302.
- [16] Charnock, S.J. and Davies, G.J. (1999) Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* **38**, 6380–6385.
- [17] Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000) The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Science* **9**, 1045–1052.
- [18] Unligil, U.M. and Rini, J.M. (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 510-517.
- [19] Gastinel, L.N., Bignon, C., Misra, A.K., Hindsgaul, O., Shaper, J.H., and Joziase, D.H. (2001) Bovine α 1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *EMBO J.* **20**, 638-649.
- [20] Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C. (2001) Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 166-175.
- [21] Tarbouriech, N., Charnock, S.J., and Davies, G.J. (2001) Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: A comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **314**, 655-661.
- [22] Holmes, E.H., Yen, T.Y., Thomas, S., Josh, R., Nguyen, A., Long, T., Gallet, F., Maftah, A., Julien, R., Macher, B. (2000) Human alpha 1,3/4 fucosyltransferases. Characterization of highly conserved cysteine residues and N-linked glycosylation sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 24237-24245.
- [23] Boeggeman, E.E., Balaji, P.V., Sethi, N., Masibay, A.S., Quasba, P.K. (1993) Expression of deletion constructs of bovine beta-1,4-galactosyltransferase in *Escherichia coli*: importance of Cys134 for its activity. *Protein Eng.* **6**, 779-785.
- [24] Wang, Y., Wong, S.S., Fukuda, M.N., Ju, H., Liu, Z., Tang, Q., Appert, H.E. (1994) Identification of functional cysteine residues in human galactosyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 701-709.
- [25] Datta, A.K., Chammas, R., Paulson, J.C. (2001) Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **276**, 15200-15207.
- [26] Ouzzine, M., Gulberti, S., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S. (2000) Structure/function of the human Gal β 1,3-glucuronyltransferase. Dimerization and functional activity are mediated by two crucial cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **275**, 28254-28260.
- [27] Angata, K., Yen, T.Y., El-Battari, A., Macher, B. A., Fukuda, M. (2001) Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity, *J. Biol. Chem.* **276**, 15369-15377.

- [28] Puthalakath, H., Burke, J., Gleeson, P.A. (1996) Glycosylation defect in Lec1 Chinese hamster ovary mutant is due to a point mutation in N-Acetylglucosaminyltransferase I gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 27818-27822.
- [29] Hardingham, T. E. & Fosang, A. J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870.
- [30] Prydz, K. & Dalen, K. T. (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell. Science* **113**, 193-205.
- [31] Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
- [32] Iozzo, R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609-652.
- [33] Hardingham, T. E.: Structure and Biosynthesis of Proteoglycans. In: Connective Tissue: Biological and Clinical Aspects. Kühn, K. & Krieg, T. (Hrsg.) Basel: Krager 143-183 (1986).
- [34] Greiling, H., Gressner, A. M., Haubeck, H. D., Keller, R. & Kleesiek, K.: Bindegewebe. In: Greiling, H., Gressner, A. M. (Hrsg.) Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer, Stuttgart, New York, 1090-1131 (1995).
- [35] Hardingham, T. E. & Bayliss, M. T. (1990) Proteoglycans of articular cartilage changes in aging and joint disease. *Semin. Arth. Rheum. Suppl.* **1**, 12-33.
- [36] Meyer-Puttlitz, B., Milev, P., Junker, E., Zimmer, I., Margolis, R. U. & Margolis, R. K. (1995) Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissues: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J. Neurochem.* **65**, 2327-2337.
- [37] Fisher, L. W., Termine, J. D. & Young, M. F. (1989) 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.
- [38] Yanagishita, M & Hascall, V. C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **67**, 9451-9454.
- [39] David, G. (1993) Integral membrane heparan sulfate proteoglycans, *FASEB J.* **7**, 1023-1030.
- [40] Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729-777.
- [41] Nikkari, S. T., Jarvelainen, H. T., Wight, T. N., Ferguson, M. & Clowes, A. W. (1994) Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am. J. Pathol.* **144**, 1348-1356.

- [42] Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. & Zhang, L. (1997) Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* **100**, 67-75.
- [43] Rostand, K. S. & Esko, J. D. (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.* **65**, 1-8.
- [44] Van Putten, J. P. M. & Paul, S. M. (1995) Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosa cells. *EMBO J.* **14**, 101-111.
- [45] Herold, B. C., Wudunn, D., Soltyx, N. & Spear, P. G. (1991) Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* **65**, 1090-1098.
- [46] Stryer, L., Biochemie, 4. Auflage. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 498-499 (1996).
- [47] Silbert, J. E. & Sugumaran, G. (1995) Intracellular membranes in the synthesis, transport and metabolism of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 371-384.
- [48] Salmivirta, M., Lidholt, K. & Lindahl, U. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J.* **10**, 1270-1279.
- [49] Gallagher, J. T. & Walker, A. (1985) Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* **230**, 665-674.
- [50] Van den Born, J., Gunnarsson, K., Bakker, M. A. H., Kjellen, L., Kusche-Gullberg, M., Maccarana, M., Berden, J. H. M. & Lindahl, U. (1995) Presence of N-unsubstituted glucosamine units in native heparan sulfate revealed by a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **270**, 31303-31309.
- [51] Philipson, L. H. & Schwartz, N. B. (1984) Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **253**, 4713-4720.
- [52] Klewes, L., Turley, E. A. & Prehm, P. (1993) The hyaluronate synthase from a eukaryotic cell line. *Biochem. J.* **290**, 791-795.
- [53] Itano, N. & Kimata, K. (1996) Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9875-9878.
- [54] Shyjan, A. M., Heldin, P., Butcher, E. C., Yoshino, T. & Briskin, M. J. (1996) Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **271**, 23395-23399.
- [55] Spicer, A. P., Olson, J. S. & McDonald, J. A. (1997) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **272**, 13997-14000.
- [56] Schwartz, N. B. (1977) Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of β -xylosidases on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *J. Biol. Chem.* **252**, 6316-6321.

- [57] Kearns, A. E., Campbell, S. C., Westley, J., Schwartz, N. B. (1991) Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: A kinetic analysis of UDP-D-xylose: core-protein β -D-xylosyltransferase. *Biochemistry* **30**, 7477-7483.
- [58] Kearns, A. E., Vertel, B. M., Schwartz, N. B. (1993) Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *J. Biol. Chem.* **268**, 11097-11104.
- [59] Vertel, B. M., Walters, L. M., Flay, N., Kearns, A. E., Schwartz, N. B. (1993) Xylosylation is an endoplasmic reticulum to golgi event. *J. Biol. Chem.* **268**, 11105-11112.
- [60] Rodén, L. (1980) Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. In *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans* (Lennarz, W.J., Ed.) 269-314, Plenum Publishers, New York, London.
- [61] Bourdon, M. A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N. B. & Ruoslahti, E. (1987) Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3194-3198.
- [62] Brinkmann, T., Weilke, C. & Kleesiek, K. (1997) Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein β -D-xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **272**, 11171-11175.
- [63] Zhang, L. & Esko, J. D. (1994) Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **269**, 19295-19299.
- [64] Sandy, J. D. (1979) The assay of xylosyltransferase in cartilage extract. A modified procedure for preparation of Smith degraded proteoglycan. *Biochem. J.* **177**, 569-574.
- [65] Coudron, C., Ellis, K., Philipson, L. and Schwartz, N. B. (1980) Preliminary characterization of a xylose acceptor prepared by hydrogen fluoride treatment of proteoglycan core protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **92**, 618-623.
- [66] Olson, C. A., Krueger, R. and Schwartz, N. B. (1985) Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycan by hydrogen fluoride in pyridine. *Anal. Biochem.* **146**, 232-237.
- [67] Campbell, S. C., Krueger, R. C. and Schwartz, N. B. (1990) Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycan and derived peptides. *Biochemistry* **29**, 907-914.
- [68] Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Rodén, L. and Fessler, J. H. (1984) Silk - a new substrate for UDP-D-xylose: proteoglycan core-protein β -D-xylosyltransferase. *Anal. Biochem.* **137**, 505-516.
- [69] Stoolmiller, A. C., Horwitz, A. L., and Dorfman, A. (1972) Biosynthesis of the chondroitin sulfate proteoglycan. Purification and properties of xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3525-3532.
- [70] Weilke, C., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. (1997) Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin. Chem.* **43**, 45-51.
- [71] Wilson, I. B. H. (2004) The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 794-809.

- [72] Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., and Hannover, J.A. (1997) O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272**, 9316-9324.
- [73] Pauschinger, M., Chandrasekharan, K. (2002) Remodeling der extrazellulären Matrix bei dilatativer Kardiomyopathie. *Herz* **27**, 677-682.
- [74] Prockop, D.J., Kivirikko, K.I. (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403-434.
- [75] Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T. & Kleesiek, K. (1999) Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 919-924.
- [76] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. (2002) Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men. *Clin. Chim. Acta.* **31**, 199-202.
- [77] Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. (2000) Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose: proteoglycan core-protein β -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J. Mol. Biol.* **304**, 517-528.
- [78] Kuhn, J., Müller, S., Schnölzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., and Kleesiek, K. (2003) High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 537-544.
- [79] Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. (2001) Isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein β -D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 4940-4947.
- [80] Cardin, A. D., and Weintraub, H. J. R. (1989) Molecular Modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32
- [81] Lawler, J., and Hynes, R.O. (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell. Biol.* **103**, 1635-1648.
- [82] Barkalow, F.J.B., and Schwartzbauer, J.E. (1991) Localization of the major heparin binding-site in Fibronectin. *J. Biol. Chem.* **266**, 7812-7818.
- [83] Margalit, H., Fischer, N., and Ben-Sasson, S.A. (1993) Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *J. Biol. Chem.* **268**, 19228-19231.
- [84] Verrecchio, A., Germanns, M.W., Schick, B.P., Kung, B., Twardowski, T., and San Antonio, J.D. (1999) Design of Peptides with High Affinities for Heparin and Endothelial Cell Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **275**, 7701-7707.
- [85] Yang, X., Wensheng, Q., Lehotay, M., Toki, D., Dennis, P., Schutzbach, J. & Brockhausen, I. (2003) Soluble human core 2 β 6-N-acetylglucosaminyltransferase C2GnT1 requires its conserved cysteine residues for full activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1648**, 62-74.

- [86] Ma, J., Colley, K.J. (1996) A disulfide-bonded dimer of the Golgi β -galactoside α 2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose. *J. Biol. Chem.* **271**, 7758–7766.
- [87] Qian, R., Chen, D., Colley, K.J. (2001) Location and mechanism of α 2,6-sialyltransferase dimer formation. Role of cysteine residues in enzyme dimerisation, localisation, activity and processing. *J. Biol. Chem.* **276**, 28641-28649.
- [88] Li, J., Yen, T.Y., Allende, M.L., Joshi, R.K., Cai, J., Pierce, W.M., Jaskiewicz, E., Darling, D.S., Macher, B.A., Young Jr., W.W. (2000) Disulfide bonds of GM2 synthase homodimers. Antiparallel orientation of catalytic domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 41476-41486.
- [89] Ju, T., Cummings, R.D., Canfield, W.M. (2002) Purification, characterization and subunit structure of rat core 1 β 1,3-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 169-177.
- [90] Kleineidam, R. G., Schmelter, T., Schwarz, R. T., and Schauer, R. (1997) Studies on the inhibition of sialyl- and galactosyltransferases. *Glycoconj. J.* **14**, 57-66.
- [91] Grancharov, K., Naydenova, Z., Lozeva, S., and Golovinsky, E. (2001) Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol. Ther.* **89**, 171-186.
- [92] Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H.R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2002) High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol. Hum. Reprod.* **12**, 1079-86.
- [93] Schwartz, N.B. (1976) Chondroitin sulfate glycosyltransferases in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **251**, 3346-3351.
- [94] Wilson, I.B.H. (2002) Functional characterisation of *Drosophila melanogaster* peptide O-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/I N-acetylglucosaminyltransferase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 21207-21212.
- [95] Hwang, H.Y., Olson, S., Brown, J.R., Esko, J.D. & Horvitz, H. (2003) The *Caenorhabditis elegans* genes *sqv-2* and *sqv-6*, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **278**, 11735-11738.
- [96] Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J. & Kleesiek, K. (2004) Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 42566-42573.
- [97] Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G. & Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.
- [98] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263.
- [99] Clark, J. M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9677-9686.

- [100] Maniatis, T., Sambrook, J. & Fritsch, E. F. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [101] Wang, K., Koop, B. T. & Hood, L. (1994) A simple method using T4 DNA polymerase to clone polymerase chain reaction products. *Biotechniques* **17**, 236-238.
- [102] Biernboim, H. C., & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513.
- [103] Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 615-619.
- [104] Sanger, F., Nickler, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- [105] Mita, K., Ichimura, S. & James, T. C. (1994) Highly repetitive structure and its organisation of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* **38**, 583-592.
- [106] 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. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 75-85.
- [107] Lottspeich, F. & Zorbes, H. (Hrsg.), *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Adad. Verlag (1998).
- [108] Gültekin, H. & Heermann, K. H. (1988) The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329.
- [109] Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *Biophys. Biochem. Methods* **10**, 203-209.
- [110] Lennox, E. S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190-206.
- [111] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- [112] Andreason, G.L., Evans, G.A. (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *BioTechniques* **6**, 650-660.

10. Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

1. Kuhn, J., **Müller, S.**, Schnölzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 Dec 19; **312** (3) :537-44
2. Götting, C., **Müller, S.**, Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J. and Kleesiek, K. (2004) Analysis of the DXD motifs in the human xylosyltransferase I required for enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 2004; Oct 8; **279** (41): 42566-42573.
3. **Müller, S.**, Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterisation of cysteine residues required for enzymatic activity. *Biochem. J.* 2004; Oct 4; doi:10.1042/BJ2004 1206 im Druck
4. **Müller, S.**, Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K., (2004) Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme, eingereicht

Kongreßbeiträge und Präsentationen:

1. Brinkmann T., **Müller S.**, Kuhn J., Götting C. & Kleesiek K (2002) Genomic organization and localization of the catalytic domain of the human xylosyltransferases. *Clin. Chem.* 48 (6) A34.
2. Götting C., **Müller S.**, Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K (2002) Exon/intron structure of the human xylosyltransferases genes and localization of the catalytic domain. Joint Annual Meeting of the German Connective Tissue Society and Southern Scandinavian Universities. *Abstractband* P20, S.26.
3. Götting C., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K (2002) Recombinant expression and genomic organization of human xylosyltransferases: key enzymes in the biosynthesis of cartilage proteoglycans. 4th ICRS Congress, Abstract CD-ROM.
4. Kleesiek K., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T., & Götting C. (2002) First recombinant expression of human xylosyltransferase I (XT-I) in insect cells. *Clin. Chem. Lab. Med.*; 40: S224.
5. Götting C., Schöttler M., **Müller S.**, Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K (2002) Genomic organization of the mammalian xylosyltransferases. 3rd International Symposium on Glycosyltransferases, Stockholm, 19.-22.9.2002.

6. Götting C., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K (2002) First recombinant expression of human xylosyltransferase I (XT-I) in insect cells and localization of the catalytic domain. 3rd International Symposium on Glycosyltransferases, Stockholm, 19.-22.9.2002.
7. Schöttler M., **Müller S.**, Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) The mammalian xylosyltransferase genes descend from a common ancient gene. *J. Lab. Med.* **26** (9/10): 514-515.
8. **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Expression of Xylosyltransferase I Variants identifies Essential Cysteine Residues Critical for the Enzymatic Activity. *J. Lab. Med.* **26** (9/10): 514.
9. Kuhn J., **Müller S.**, Schöttler M., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Heparin is a predominantly non-competitive inhibitor of xylosyltransferase. *J. Lab. Med.* **26** (9/10): 514.
10. **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Identification of cysteine residues of Xylosyltransferase I critical for the enzymatic activity. *Wiener Klinische Wochenschrift* **114**, Suppl. 4, 32-33.
11. Kuhn J., **Müller S.**, Schöttler M., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Heparin inhibits human xylosyltransferase predominantly non-competitive. *Wiener Klinische Wochenschrift* **114**, Suppl. 4, 32.
12. Götting C., Kuhn J., **Müller S.**, Schöttler M., Brinkmann T. & Kleesiek K (2002) Xylosyltransferasen: Genstruktur, rekombinante Darstellung und Untersuchungen zur Enzymaktivität in humaner Follikelflüssigkeit. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* **33** (3/4): 57-59.
13. Schöttler M., **Müller S.**, Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Mammalian xylosyltransferases: Exon/intron structure and identification of exons critical for the XT-I activity. 13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Münster/Raesfeld, *Abstractband* S. 59.
14. Götting C., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K. (2002) Identification of the essential DxD motif in the human xylosyltransferase I. 13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Münster/Raesfeld, *Abstractband* S. 38.
15. **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2002) Expression of human xylosyltransferase I variants in insect cells. 13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Münster/Raesfeld, *Abstractband* S. 20.
16. **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek, K. (2003) Xylosyltransferase I, the key enzyme in the biosynthesis of proteoglycans: recombinant expression and activity of XT-I variants. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Ulm, *Abstractband* S. 73.

17. Kuhn J., **Müller S.**, Schöttler M., Schön S., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek, K. (2003) Heparin is a non-competitive inhibitor of xylosyltransferase I. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Ulm, *Abstractband* S. 67.
18. Schöttler M., **Müller S.**, Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek, K. (2003) Identification of exons which are critical for the xylosyltransferase I activity. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Ulm, *Abstractband* S. 84.
19. Götting C., **Müller S.**, Schöttler M., Schön S., Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K. (2003) Expression of xylosyltransferase I variants identifies essential cysteine residues critical for the enzymatic activity. EUROMEDLAB Barcelona, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, S. 215.
20. Götting C., Schöttler M., **Müller S.**, Schön S., Kuhn J., Brinkmann T. & Kleesiek K. (2003) Characterization of the gene structure of the murine and human xylosyltransferases. EUROMEDLAB Barcelona, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, S. 215.
21. Schön S., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Schulz V., Szliska C., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2003) Identification of polymorphisms and mutations in the human Xylosyltransferase I (XT-I) gene by DHPLC in Blood Donors and Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) patients, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.*; **41**, (10) A95.
22. Kuhn J., **Müller S.**, Schön S., Schöttler M., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek K. (2003) A fragment of the basic fibroblast growth factor is a good substrate for human xylosyltransferase I, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.*; **41**, (10) A116.
23. **Müller S.**, Schöttler M., Schön S., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek, K. (2003) Aminoterminal truncated Xylosyltransferase I variants: localization of a core enzyme needed for the enzymatic activity, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.*; **41**, (10) A117.
24. Schöttler M., **Müller S.**, Schön S., Kuhn J., Brinkmann T., Götting C. & Kleesiek, K. (2003) Further insights into the exon/intron structure of the Xylosyltransferase I gene, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.*; **41**, (10) A76.
25. **Müller S.**, Schöttler M., Schön, S., Prante, C., Kuhn, J., Götting C. & Kleesiek K. (2003) Analysis of xylosyltransferase activity from the shark *prionace glauca*. 14th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Lille, Frankreich, *Abstractband* S. 55.
26. Schön, S., **Müller S.**, Schöttler M., Kuhn J., Prante, C., Schulz, V., Szliska, C. Götting, C. & Kleesiek K. (2003) Detection of genetic variations in the human xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in blood donors and *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) patients. 14th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Lille , Frankreich, *Abstractband* S. 26.
27. Prante, C., **Müller, S.**, Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C. & Kleesiek, K. (2003) Dilated Cardiomyopathy (DCM): xylosyltransferase I and II mRNA quantification in heart tissues using a new real-time RT-PCR method. 14th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der

- GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Lille , Frankreich, *Abstractband* S. 27.
28. Kuhn J., **Müller S.**, Schöttler, M., Brinkmann, T., Götting, C. & Kleesiek, K. (2003) LMW-Heparin is a predominantly non-competitive inhibitor of xylosyltransferase I. 14th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Lille , Frankreich, *Abstractband* S. 42.
 29. **Müller S.**, Schön, S., Schöttler M., Prante, C., Kuhn, J., Götting C. & Kleesiek K. (2004) Xylosyltransferase I, the key enzyme in the biosynthesis of proteoglycans: analysis of XT-activity from extant jawed vertebrates, the shark *prionace glauca*. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband* S. 52.
 30. Prante, C., **Müller, S.**, Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C. & Kleesiek, K. (2004) Influence of left ventricular assist devices (LVAD) on the XT-I mRNA expression in patients with a dilated cardiomyopathy (DCM). Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband* S. 57.
 31. Schöttler M., **Müller S.**, Schön S., Prante, C., Kuhn J., Götting C. & Kleesiek, K. (2004) Xylosyltransferase I activity monitored in patients after heart transplantation and patients after ventricular assist device implantation. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband* S. 64.
 32. **Müller S.**, Schön, S., Schöttler M., Prante, C., Kuhn, J., Götting C. & Kleesiek K. (2004) Human Xylosyltransferase I: Effect of Mutations on Binding to UDP and Heparin. Düsseldorf, *Clin. Chem. Lab. Med.*; **42**, (10), B07, *Abstractband* S. A122.
 33. Prante, C., **Müller, S.**, Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C. & Kleesiek, K. (2004) Mechanical Stress Regulates Proteoglycan Synthesis in Failing Human Heart. , *Clin. Chem. Lab. Med.*; **42**, (10), F08, *Abstractband* S. A136.
 34. **Müller S.**, Schön, S., Schöttler M., Prante, C., Kuhn, J., Götting C. & Kleesiek K. (2004) Characterisation of recombinant Xylosyltransferase I and Cys mutant enzymes. 15th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Wageningen, NL, *Abstractband* S. 395.
 35. Prante, C., **Müller, S.**, Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K. & Götting, C. (2004) Xylosyltransferase I: a new marker for the fibrotic degeneration of heart in dilated cardiomyopathy. 15th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Wageningen, NL, *Abstractband* S. 412.
 36. Schön, S., Prante, C., **Müller, S.**, Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Götting, C., & Kleesiek, K. (2004) Polymorphisms in the xylosyltransferase genes XT-I and XT-II and the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. 4th International Symposium on Glycosyltransferases, Le Touquet, Frankreich, *Abstractband* S. 51.

Kongreßvorträge:

- **Müller S.** (2002) Expression of human xylosyltransferase I variants in insect cells. 13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Münster/Raesfeld, November 2002.
- **Müller S.** (2004) Characterisation of recombinant Xylosyltransferase I and Cys mutant enzymes. 15th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Wageningen, Niederlande, November 2004.