

- Institut für physiologische Chemie -

**Charakterisierung und Funktionsanalyse
der Untereinheiten des
hetero-oligomeren Oligosaccharyltransferase-Komplexes
aus Schweineleber**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am 5.12.2005

von Susanne Bongart

aus

Bad Neuenahr-Ahrweiler

Referent: Prof. Dr. E. Bause

Korreferentin: Prof. Dr. B. Schmitz

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Kurzfassung

Charakterisierung und Funktionsanalyse der Untereinheiten des hetero-oligomeren Oligosaccharyltransferase-Komplexes aus Schweineleber

Die Oligosaccharyltransferase (OST), ein Schlüsselenzym der N-Glykoproteinbiosynthese, katalysiert die Übertragung Dol-PP-aktivierter Oligosaccharide auf spezifische Asparaginreste wachsender Polypeptidketten. Die OST aus Schweineleber wurde als hetero-oligomerer Komplex gereinigt, der OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und ein weiteres 40 kDa Protein enthielt. Daneben scheinen DAD1 und STT3 weitere Untereinheiten des OST-Komplexes darzustellen. Die spezifischen Funktionen der Untereinheiten sowie die tatsächliche Zusammensetzung des Enzym-Komplexes sind in wesentlichen Punkten noch unverstanden.

Mit dem Ziel, Aminosäuren im aktiven Zentrum der OST zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse der Hemm-Messungen mit TLCK, einem Reagenz, das mit Histidinseitenketten im aktiven Zentrum von Enzymen reagieren kann, sprechen für das Vorhandensein eines Histidinrestes am aktiven Zentrum der OST und für dessen Beteiligung an der Katalyse. Untersuchungen mit einem Hexapeptid, in das zwei 5-Azido-2-nitrobenzoylgruppen eingeführt worden waren, zeigten, daß dieses Peptid ein gutes Substrat der OST darstellt und die OST in einer zeitabhängigen Reaktion zu hemmen vermag, die Hemmung war jedoch insgesamt nur mäßig. Um spezifische Funktionen der Untereinheiten im OST-Komplex zu untersuchen, wurde die cDNA von DAD1 kloniert. Aktivitätsmessungen mit den verschiedenen Untereinheiten (OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1), die in COS 1-Zellen überexprimiert worden waren, zeigten, daß die Untereinheiten für sich alleine als katalytisch inaktive Proteine synthetisiert werden, wohingegen die Koexpression von OST48 und Ribophorin I zu einem reproduzierbaren Aktivitätsanstieg von ca. 80 % -bezogen auf Kontrollzellen- führte. Dies läßt vermuten, daß OST48 und Ribophorin I direkt an der Katalyse beteiligt sind. Aktivitätsmessungen mit OST48 und Ribophorin I, die unter zellfreien Bedingungen in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem synthetisiert worden waren, haben gezeigt, daß die Synthese beider Untereinheiten zusammen auch hier zu einer zwar mäßigen (~25 %igen) aber reproduzierbaren Erhöhung der OST-Aktivität führte.

Abstract

Characterisation and functional analysis of subunits of the hetero-oligomeric oligosaccharyltransferase-complex of pig liver

The oligosaccharyltransferase (OST) a key enzyme of the N-linked biosynthesis, catalyses the transfer of Dol-PP-activated oligosaccharides to selected asparagine side chains of nascent polypeptides. OST from pig liver was purified as a hetero-oligomeric complex composed of four subunits (OST48, Ribophorin I, Ribophorin II and a 40 kDa protein). DAD1 and STT3 seem to be further subunits of the mammalian OST-complex. The specific functions of the different subunits and the structure of the enzyme remain unknown at present.

In order to identify amino acids in the active site of the complex OST activity was measured in the presence of different inhibitors. Studies with N-tosyl-L-lysine-chlormethylketone (TLCK), a reagent that reacts with histidine side chains at the active site of enzymes, indicate that histidine is located at the active site and is involved in catalysis. Investigations with a hexapeptide containing two photoactivatable azido groups led to an inactivation of the OST in a time-dependent manner, which was however moderate. In order to investigate specific functions of the different subunits the cDNA of DAD1 was cloned. Expression studies with the different subunits (OST48, Ribophorin I, Ribophorin II, DAD1) showed that the single subunits when over expressed in COS 1-cells were without catalytic activity. Co-expression of OST48 and Ribophorin I resulted in a reproducible increase (~80%) in OST activity, suggesting that OST48/Ribophorin I are directly involved in catalysis. Investigations with OST48 and Ribophorin I, which were expressed *in vitro* in a coupled transcription-/translation system, have shown that the co-expression of both proteins results in a modest (~25 %) but reproducible increase in OST activity.

INHALTSSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Ergebnisse	6
2.1	Eigenschaften der Oligosaccharyltransferase aus Schweineleber	6
2.2	Versuche zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der Oligosaccharyltransferase	11
2.2.1	Hemm-Messungen mit N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon (TLCK)	11
2.2.2	Hemm-Messungen mit photoaktivierbaren Peptiden	13
2.3	Charakterisierung der OST-Untereinheiten	17
2.3.1	Klonierung von DAD1 aus Schweineherzmuskel	17
2.3.2	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das DAD1-Gesamtprotein	19
2.3.2.1	Expression von DAD1 in <i>E. coli</i>	20
2.3.2.2	Aufreinigung und Spaltung des Fusionsproteins	21
2.3.2.3	Immunisierung von Kaninchen	21
2.3.3	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen DAD1-spezifische Peptide	22
2.3.4	Expression von DAD1 in COS 1-Zellen	25
2.3.5	DAD1-GFP wird als ER-residentes Fusionsprotein exprimiert	26
2.3.6	Charakterisierung von OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 nach Expression in COS 1-Zellen	27
2.3.6.1	Expression der einzelnen Untereinheiten	27
2.3.6.2	Koexpression verschiedener OST-Untereinheiten	31
2.3.7	<i>In vitro</i> Synthese der OST-Untereinheiten in <i>E. coli</i> -Lysaten	34
2.3.7.1	Optimierung der Basensequenz im 5'-kodierenden Bereich von OST48 und Ribophorin I	35
2.3.7.2	Charakterisierung der im RTS100 synthetisierten OST48- und Ribophorin I-Untereinheiten	39
2.3.7.3	Aktivitätsmessungen mit Dol-PP-GlcNAc ₂ -M ₉ -[¹⁴ C]G ₃	41
2.3.8	Klonierung und Charakterisierung von STT3 aus menschlicher Leber	42
3	Diskussion	47
4	Zusammenfassung	54

5	Experimenteller Teil	56
5.1	Geräte	56
5.2	Materialien	57
5.3	Isolierung von Schweinelebermikrosomen	60
5.4	Enzymatische Messungen.....	60
5.4.1	Darstellung von Dol-PP-[¹⁴ C]Chitobiose und Dol-PP-GlcNAc ₂ -M ₉ -[¹⁴ C]G ₃ ..	60
5.4.2	Standardassay nach Bause (1979)	61
5.4.3	Modifizierter Assay nach Breuer & Bause (1995)	62
5.4.4	Hemm-Messungen	62
5.4.5	Radioaktivitätsmessung.....	63
5.5	Allgemeine analytische Methoden	64
5.5.1	Proteinbestimmung nach Lowry (Wang & Smith 1975)	64
5.5.2	Proteinfällung mittels Chloroform/Methanol	64
5.5.3	Nachweis von Proteinen.....	65
5.5.3.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese.....	65
5.5.3.2	Tricine-SDS-PAGE nach Schagger & Jagow (1987)	65
5.5.3.3	Coomassie-Färbung	67
5.5.3.4	Silberfärbung nach Harlow & Lane (1987).....	67
5.5.3.5	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Towbin 1979).....	67
5.5.3.6	Ponceau-Färbung.....	68
5.6	Immunologische Methoden	68
5.6.1	Herstellung von Antikörpern gegen DAD1	68
5.6.1.1	Antigenherstellung durch Expression von DAD1 in <i>E. coli</i>	68
5.6.1.2	Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung der Antikörper	69
5.6.1.3	Herstellung von Antikörpern gegen Peptide	69
5.6.2	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall 1981).....	70
5.6.3	Immunoblotanalyse (Blake 1984; Theisen 1986)	70
5.6.4	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	71
5.7	Molekularbiologische Methoden (Sambrook et al. 1989).....	72
5.7.1	Lösungen und Medien	72
5.7.2	Screenen von cDNA-Banken.....	73
5.7.3	Umklonierung und Analyse rekombinanter Bakterien.....	73
5.7.3.1	Auffüllreaktion und Restriktionsverdau	73

5.7.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	74
5.7.3.3	Agarosegelextraktion.....	75
5.7.3.4	DNA-Transfer nach Southern (Southern 1975)	75
5.7.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	75
5.7.3.6	Herstellung und Transfektion kompetenter Zellen	76
5.7.3.7	Reinigung von Plasmid-DNA	77
5.7.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Sakai et al. 1988; White 1993)	78
5.7.3.9	DNA-Sequenzierung.....	79
5.7.4	Analyse von mRNA	80
5.7.4.1	Reinigung von mRNA	80
5.7.4.2	Erststrang-Synthese	81
5.7.5	Transfektion und Analyse von COS 1-Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode (Ausubel et al. 1987)	82
5.7.6	<i>In vitro</i> Transkription/Translation	84
5.7.6.1	Radioaktive Transkription/Translation	84
5.7.6.2	Gekoppelte Transkription/Translation mit dem RTS-System der Fa. Roche	84
6	Literatur	87
7	Anhang	90
7.1	Primer.....	90
7.1.1	DAD1	90
7.1.2	OST48	90
7.1.3	Ribophorin I.....	91
7.1.4	STT3.....	92
7.2	Herstellung der Vektorkonstrukte	93
8	Abkürzungsverzeichnis	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin	Dol-PP	Dolicholpyrophosphat
Ala	Alanin	DTAF	Dichlortriazinylamino- fluorescein
Amp	Ampicillin	DTT	Dithiothreitol
APS	Ammoniumpersulfat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Arg	Arginin	ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Asn	Asperagin	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Asp	Asperaginsäure	g	Erdbeschleunigung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	g	Gramm
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3- indoylphosphat	G	Guanosin
bp	Basenpaare	GFP	green fluorescent protein
BSA	Rinderserumalbumin	Glc, G	Glucose
Bz	Benzoyl-	GlcNAc	N-acetylglucosamin
C	Cytidin	Gly	Glycin
cDNA	complementary DNA	GST	Glutathion-S-Transferase
CIP	calf intestine phosphatase	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
cpm	Impulse pro Minute	h	Stunde
Da	Dalton	His	Histidin
DABCO	1.4-Diazo- bicyclo[2.2.2]octan	IPTG	Isopropylthiogalactosid
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonucleosid- 5'-triphosphat	k	Kilo-
DEAE	Diethylaminoethyl	l	Liter
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LB	Luria-Bertholdi Medium
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	m	milli
DMF	Dimethylformamid	M	Molar
DMSO	Dimethylsulfat	Man, M	Mannose
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minute
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'- triphosphat	MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
Dol-P	Dolicholphosphat	μ	mikro
		n	nano
		N ₃ NO ₂ Bz	5-Azido-2-nitrobenzoyl-

NaAc	Natriumacetat	T	Thymidin
-NHMe	-N-methylamid	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
ORF	Offenes Leseraster	TCA	Trichloressigsäure
OST	Oligosaccharyltransferase	TE	Tris-EDTA
p	pico	TEMED	N,N,N',N'-Tetra- methylethyldiamin
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	T _m	DNA Schmelztemperatur
PBS	phosphate buffered saline	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PCR	polymerase chain reaction	U	Units
PEG	Polyethylenglykol	UDP	Uridin-5'-diphospho-N-acetyl -D-glucosamin
pfu	plaquebildende Einheiten	üN	über Nacht
RNase	Ribonuclease	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur	Xaa	Beliebige Aminosäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SSC	sodium salt citrate		

1 Einleitung

Die Mehrzahl sekretorischer Proteine und Membranproteine tragen Kohlenhydrat-Reste. Diese Glykoproteine üben vielfältige Funktionen aus. So vermitteln sie z. B. Zell-Zell-Wechselwirkungen, dienen als Immunglobuline oder sind am Aufbau von Zellwänden beteiligt (Durand & Seta 2000). Glykoproteine lassen sich in zwei Typen unterteilen:

- O-Glykoproteine, bei denen die Kohlenhydratketten an Serin- und Threoninreste geknüpft sind.
- N-Glykoproteine, bei denen die Bindung der Zuckerkette über die Säureamidfunktion von Asparagin erfolgt.

Während die Zuckerketten der O-Glykoproteine schrittweise unter Verwendung Nukleosiddiphosphat-aktivierter Monosaccharide durch spezifische Glykosyltransferasen aufgebaut werden (Hart et al. 1989), erfolgt die Bildung der N-glykosidischen Oligosaccharidketten durch einen wesentlich komplizierteren Prozeß, der sich formal in drei molekulare Ereignisse unterteilen läßt:

1.) **Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-G₃**

Die Schritte zur Bildung des Dol-PP-Tetradecasaccharidvorläufers sind schematisch in *Abb. 1-1* dargestellt (Dol-P-Zyklus). Der Aufbau des Oligosaccharidvorläufermoleküls beginnt mit der Übertragung eines aus UDP-GlcNAc stammenden N-Acetylglucosamin-1-phosphats auf Dolicholphosphat, das als Verankerung der wachsenden Saccharidkette in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dient. In den nächsten Schritten werden auf das so entstandene Dol-PP-GlcNAc ein weiterer GlcNAc-Rest sowie fünf Mannosereste übertragen, wobei Nukleosid-aktivierte Zucker als Donoren dienen. Das Dol-PP-gebundene Heptasaccharid wird anschließend um weitere vier Mannosen und drei Glucosen verlängert, wobei als Glykosyldonoren Dol-P-Mannosen bzw. Dol-P-Glucosen dienen.

2.) **„En-bloc“ Übertragung der Saccharidkette**

Das im Dol-P-Zyklus gebildete Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-G₃ wird im Lumen des ERs „en-bloc“ durch die Oligosaccharyltransferase (OST) auf spezifische Asparaginreste der wachsenden Polypeptidkette übertragen.

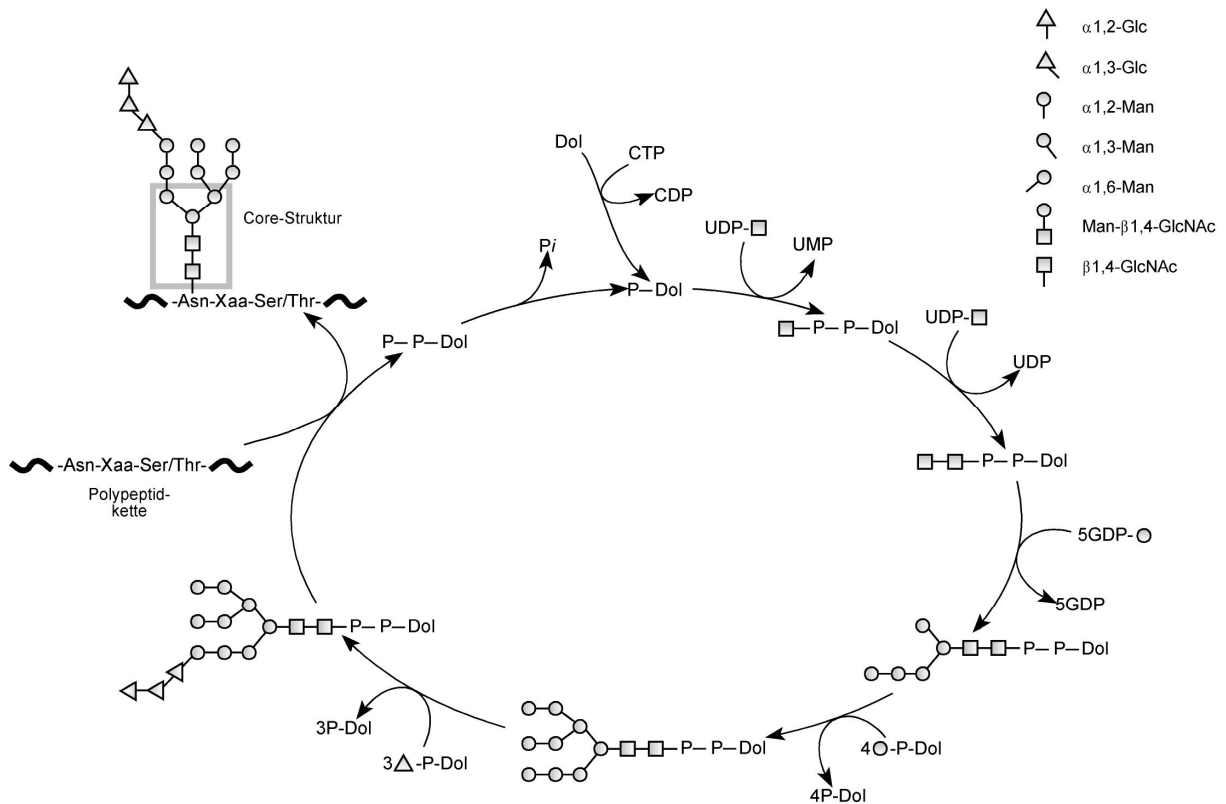


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Dolichol-P-Zyklus

3.) Umbau zur reifen Zuckerstruktur

Nach Übertragung des Oligosaccharidvorläufers auf die Polypeptidkette kommt es zu einer schrittweisen Abspaltung der Glucose- und mehrerer Mannosereste, bis schließlich eine Kernregion übrig bleibt, die nur noch aus N-Acetylglucosaminen und Mannosen besteht. An diese werden im Golgi-Apparat mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen weitere Saccharide (N-Acetylglucosamin, Galaktose, Fucose und Sialinsäure) eingeführt.

Auf diesem Weg gelingt es der Zelle aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül ein großes Spektrum N-glykosidisch gebundener Zuckerstrukturen zu bilden, die in Abhängigkeit von Art, Verzweigung und Zusammensetzung in komplexe, hybride und mannosereiche Oligosaccharide unterteilt werden (Kornfeld & Kornfeld 1985).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Oligosaccharyltransferase, dem Enzym, das den „en bloc“ Transfer des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharids auf die wachsende Polypeptidkette katalysiert (Abb. 1-2).

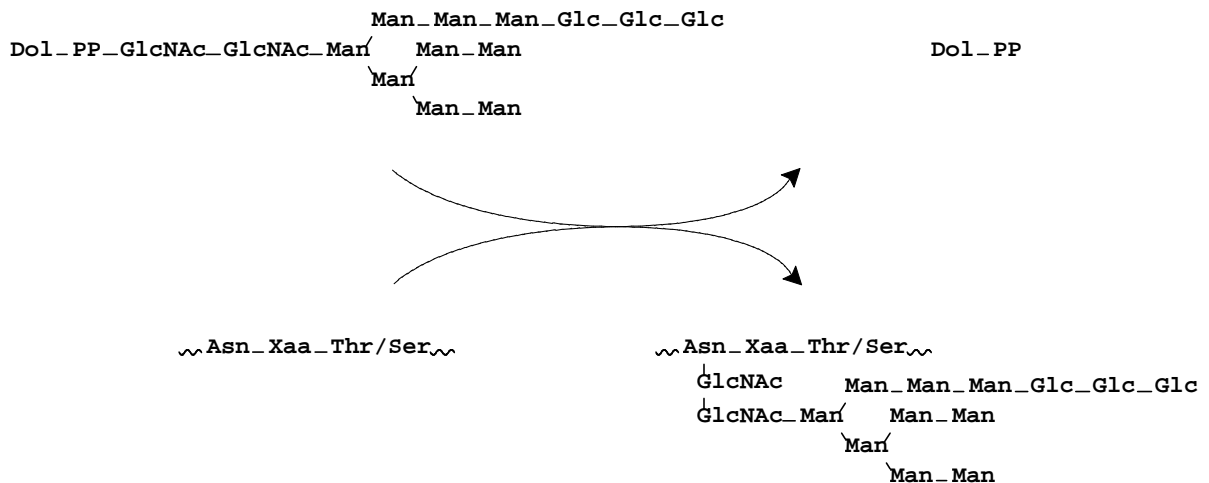


Abb. 1-2: Übertragung des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharidvorläufers durch die OST auf spezifische Asparaginreste der wachsenden Polypeptidkette

Auf der Basis von Struktur- und Sequenzinformationen von Glykoproteinen wurde die Hypothese aufgestellt, daß das Triplet Asn-Xaa-Thr für die N-Glykosylierung ein notwendiges aber nicht hinreichendes Signal darstellt (Marshall 1972). Diese Hypothese wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen durch Messungen mit synthetischen Peptiden als Modells substrate experimentell bestätigt (Ronin et al. 1978, Bause 1979). Modelluntersuchungen zeigten zudem, daß Asn-Xaa-Thr/Ser Sequenzen nicht glykosylierbar sind, wenn Xaa Prolin ist oder Prolin direkt der Tripletsequenz folgt (Bause 1983). In der Tat ist bis heute kein Glykoprotein identifiziert worden, bei denen eine Signalsequenz mit Prolin in diesen Positionen vorlag, was die Übertragung dieser Modellexperimente auf die *in vivo* Situation dokumentiert.

Die N-Glykosylierung findet vermutlich durch einen nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares am Säureamidstickstoff von Asparagin am C1-Atom des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharids statt. Für den Ablauf der Glykosylierung werden zwei Modelle diskutiert, die beide davon ausgehen, daß für die Erkennung der N-Glykosylierungsstelle eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxyaminosäure und der Seitenkette von Asparagin wichtig ist. Beide Modelle unterscheiden sich jedoch in der Zahl und der Orientierung der Wasserstoffbrückenbindungen. Bei dem 1981 von Bause & Legler vorgeschlagenen Modell (Abb. 1-3, A) erfolgt die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Interaktion zwischen dem β -Amidstickstoff von Asparagin als H-Donor und der OH-Gruppe von Thr/Ser als H-Akzeptor, wobei als Folge dieser Wechselwirkungen die Nukleophilie des β -Amidstickstoffs erhöht wird. Im Verlaufe der Glykosylierung übernimmt die Hydroxyaminosäure dann ein Proton von

der β -Amidsäurefunktion, wobei der eigene Wasserstoff als Proton an eine Base im aktiven Zentrum der OST abgegeben wird.

Das 1992 von Imperiali et al. vorgeschlagene Modell (Abb. 1-3, B) postuliert, daß die Peptidkette im Bereich der Asn-Xaa-Thr/Ser Sequenz in einer Asx-turn Konformation vorliegt, die durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der β -Carbonylgruppe von Asparagin als Akzeptor und der α -NH- und β -OH-Gruppe der Hydroxyaminosäure als Donor, stabilisiert wird. Als Folge dieser Wechselwirkungen soll die Azidität der β -Amidgruppe soweit erhöht werden, daß am aktiven Zentrum ein Proton abdissoziiert und es zur Ausbildung einer Imidatstruktur kommt, die am C1-Atom des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharids nukleophil angreift. Welches der beiden Katalysemodelle die Situation am aktiven Zentrum der OST korrekt beschreibt ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

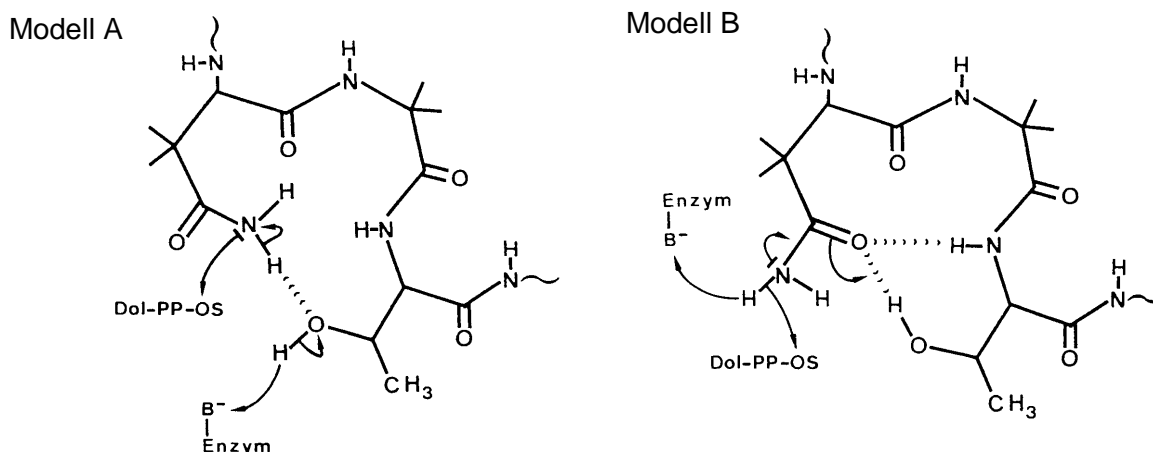


Abb. 1-3: Modell zum Reaktionsmechanismus der Oligosaccharyltransferase:
Modell A nach Bause & Legler (1981); Modell B nach Imperiali et al. (1992)

In den vergangenen Jahren ist es gelungen, die Oligosaccharyltransferase aus verschiedenen Geweben und Spezies zu reinigen, so u. a. aus Hundepankreas (Kelleher et al. 1992), menschlicher Leber (Kumar et al. 1995) und von unserer Arbeitsgruppe aus Schweineleber (Breuer & Bause 1995). Verschiedene gereinigte OST-Präparationen enthielten alle Ribophorin I, Ribophorin II und OST48 als Untereinheiten, wobei in dem von uns gereinigten Leberpräparat noch eine weitere 40 kDa Untereinheit identifiziert wurde. Verschiedene experimentelle Untersuchungen sprechen dafür, daß

OST48 oder Ribophorin I bzw. beide die katalytischen Untereinheiten darstellen. So ließ sich aus dem gereinigten OST-Komplex aus Schweineleber eine katalytisch aktive Fraktion abtrennen, die ausschließlich OST48 und Ribophorin I enthielt (Bause & Breuer 1995). Zum anderen wurden beide Untereinheiten spezifisch doppelmarkiert, wenn Schweinelebermikrosomen in Anwesenheit von Dol-PP-[¹⁴C]Oligosacchariden mit einem Inhibitorpeptid inkubiert wurden, bei dem die Hydroxyamino-säure in Asn-Xaa-Thr durch Epoxyethylglycin ersetzt wurde (Bause et al. 1997). Kelleher & Gilmore konnten 1997 zeigen, daß DAD1 (Defender against apoptotic cell death) ebenfalls eine Untereinheit der Oligosaccharyltransferase darstellt. DAD1 wurde ursprünglich als Protein identifiziert, daß eine Rolle beim programmierten Zelltod spielt (Nakashima et al. 1993). Untersuchungen an einer BHK-Zelllinie (tsBN7) weisen darauf hin, daß DAD1 vermutlich für die Stabilität des OST-Komplexes von Bedeutung ist (Sanjay et al. 1998). Als weitere Untereinheit des OST-Komplexes wurde STT3 identifiziert. Mutageneseexperimente in Hefe lieferten Hinweise, daß STT3 eine Rolle bei der Substraterkennung und bei der Katalyse spielt (Yan & Lennarz 2002).

Die zusammengefaßten Daten zeigen, daß der Aufbau der Oligosaccharyltransferase außerordentlich kompliziert ist. Sowohl die tatsächliche Zusammensetzung des Enzyms als auch die spezifische Funktion der Untereinheiten ist bisher in wesentlichen Punkten noch unverstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die OST aus Schweineleber bzw. die Untereinheiten des oligomeren OST-Komplexes näher zu charakterisieren. Durch Hemm-Messungen und Markierungsexperimente mit verschiedenen Inhibitoren sollte zunächst versucht werden, mögliche an der Katalyse der OST beteiligte Aminosäuren im aktiven Zentrum der OST nachzuweisen. Darüber hinaus sollten durch Koexpression von OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 in COS1-Zellen strukturelle und katalytische Eigenschaften der exprimierten Untereinheiten näher untersucht werden. Schließlich sollte versucht werden, OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 unter zellfreien Bedingungen zu synthetisieren und katalytische Aktivität durch Einbau der verschiedenen Untereinheiten in Liposomen zu rekonstituieren, um so Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen der Untereinheiten zu erhalten.

2 Ergebnisse

2.1 Eigenschaften der Oligosaccharyltransferase aus Schweineleber

Die Oligosaccharyltransferase stellt ein Schlüsselenzym der Biosynthese der N-Glykoproteine dar. Das Enzym katalysiert die Übertragung Dol-PP-aktivierter Oligosaccharide mit der Zusammensetzung $\text{GlcNAc}_2\text{-M}_9\text{-G}_3$ auf den β -Amidstickstoff eines Asparaginrestes der wachsenden Polypeptidkette, sofern die Akzeptoraminosäure Teil einer Signalsequenz vom Typ Asn-Xaa-Thr/Ser ist (Bause 1979). Aufgrund der hohen Spezifität der Transferasereaktion läßt sich die Aktivität des Enzyms in mikrosomalen Fraktionen und Zellextrakten durch Inkubation mit Dol-PP- ^{14}C -markierten Oligosacchariden und einem entsprechenden Peptidsubstrat, das die Markersequenz Asn-Xaa-Thr trägt, messen. In der vorliegenden Arbeit wurde die OST-Aktivität mit dem von Bause (1979) entwickelten Assay bestimmt, wobei Dol-PP- ^{14}C GlucNAc₂ als Glykosyldonor und Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe als Akzeptorsubstrat diente. Abb. 2-1 zeigt eine typische zeitabhängige N-Glykosylierung des Akzeptortripeptids nach Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit Dol-PP- ^{14}C Chitobiose.

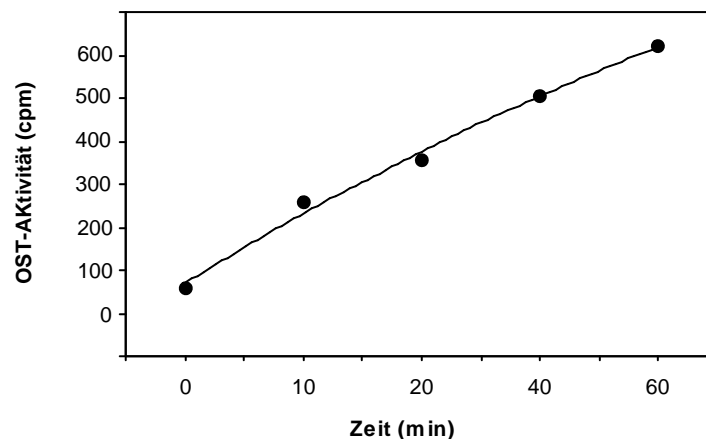


Abb. 2-1: Zeitabhängige Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe mit Dol-PP- ^{14}C GlucNAc₂
Schweinelebermikrosomen wurden mit 2000 cpm Dol-PP- ^{14}C Chitobiose und 1 mM Akzeptortripeptid unter Standardbedingungen (s. Experimenteller Teil) inkubiert.

Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe von Chloroform/Methanol/Wasser (3:2:1; v/v/v) abgestoppt und die Ansätze zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die Menge des ^{14}C -glykosylierten Tripeptids in der wäßrigen Oberphase durch Scintillationsmessung ermittelt. Wie an der Zunahme der Radioaktivität in der wäßrigen Oberphase zu sehen ist, erfolgt eine zeitabhängige N-Glykosylierung des Peptidsubstrats. Ein nach längeren Inkubationszeiten zu beobachtendes Abweichen der Glykosylierungsrate von der Linearität ist vermutlich Folge einer Substratverarmung.

Da der OST-Komplex membrangebunden und das als Glykosyldonor im Standardassay eingesetzte Dol-PP-GlcNAc₂-Derivat nicht wasserlöslich ist, müssen die Aktivitätsmessungen in Anwesenheit von Detergenzien durchgeführt werden. Um optimale Inkubationsbedingungen für die geplanten Hemm-Messungen und Rekonstitutionsexperimente vorzubereiten, wurde in Vorversuchen der Einfluß verschiedener Detergenzien auf die OST-Aktivität überprüft. Hierzu wurden Schweinelebermikrosomen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von N-Octyl- β -D-glucosid (Octylglucosid), N-Dodecyl- β -D-maltosid (Dodecylmaltosid), Triton X-100 bzw. Desoxycholat 1 h bei 4°C vorinkubiert und die OST-Aktivität anschließend im Standardassay mit Dol-PP-[^{14}C]Chitobiose und Bz-Asn-Xaa-Thr-NHMe gemessen. Wie in *Abb. 2-2 A* dargestellt, steigt die N-Glykosylierungsrate mit zunehmender Octylglucosidkonzentration an und erreicht bei etwa 1 % des Detergenz ein Maximum; höhere Konzentrationen an Octylglucosid führen hingegen wieder zu einem Abfall der Aktivität. Zugabe steigender Konzentrationen von Dodecylmaltosid, Triton X-100 und Desoxycholat führen ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Glykosylierungsrate, wobei das Maximum der OST-Aktivität im Falle von Dodecylmaltosid bei etwa 2 % (*Abb. 2-2 B*), von Triton X-100 bei etwa 1,2 % (*Abb. 2-2 C*) und Desoxycholat bei etwa 0,1 % (*Abb. 2-2 D*) liegt.

Auffallend an den dargestellten Konzentrationsabhängigkeiten ist, daß die im jeweiligen Maximum gemessenen Glykosylierungsraten im Falle von Dodecylmaltosid, Triton X-100 und Desoxycholat etwa 2fach höher sind, verglichen mit der Aktivität, die in Anwesenheit von 1 % Octylglucosid gemessen wurde. Eine Erklärung für diese Beobachtungen kann nicht gegeben werden. Möglicherweise ist der hydrophobe Rest im Octylglucosid zu kurz, um eine entsprechende Solubilisierung des OST-Komplexes zu erreichen.

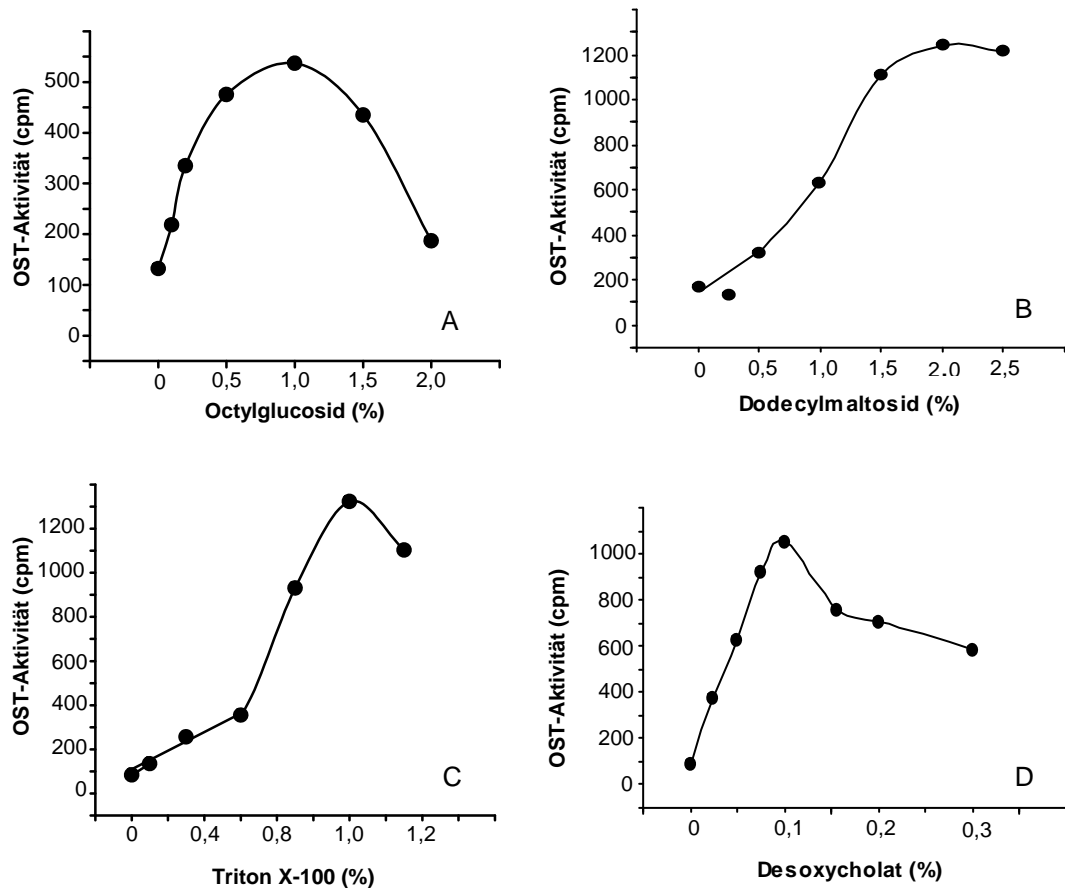


Abb. 2-2: *Einfluß verschiedener Detergenzien auf die OST-Aktivität*
 Schweinelebermikrosomen wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Octylglucosid (A), Dodecylmaltosid (B), Triton X-100 (C) und Desoxycholat (D) inkubiert und anschließend mit 2000 cpm Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ und 1 mM Akzeptorpeptid auf OST-Aktivität geprüft.

Verschiedene experimentelle Hinweise sprechen dafür, daß die katalytische Aktivität der OST durch Phospholipide beeinflusst wird bzw. eine bestimmte Phospholipidumgebung zur Ausbildung katalytischer Aktivität erforderlich ist (Chalifour & Spiro 1988; Breuer & Bause 1995). So hatten Breuer & Bause (1995) gezeigt, daß ein katalytisch inaktiver OST-Komplex, der nach Abtrennung der Phospholipide bei der Reinigung des Enzyms erhalten wurde, durch Zugabe von Phosphatidylcholin nahezu vollständig wieder aktiviert werden konnte.

Da geplant war, den OST-Komplex in Liposomen zu rekonstituieren, wurden systematische Voruntersuchungen durchgeführt, um den Einfluß verschiedener Phospholipide auf die Aktivität der OST aus Schweineleber zu charakterisieren. Hierzu wurden Schweinelebermikrosomen zunächst in Anwesenheit von 1,2 % Triton X-100, 0,1 %

Dosoxycholol bzw. 1 % Octylglucosid vorinkubiert und dann die OST-Aktivität nach Zugabe unterschiedlicher Phospholipide im Standardassay gemessen. Wie in *Abb. 2-3 A* zu sehen ist, führte die Zugabe von Phosphatidylcholin in der mit Triton X-100 solubilierten Mikrosomenfraktion zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der OST-Aktivität, die bei 0,3 % des Phospholipids ein Maximum erreicht. Ähnliche Ergebnisse werden von Breuer & Bause (1995) im Rahmen der Reinigung des Enzyms beschrieben. Eine deutlich geringere Aktivitätssteigerung wurde mit Phosphatidylethanolamin gemessen (nicht gezeigt), während die Zugabe von Phosphatidsäure zu einer starken Aktivitätsabnahme führte (*Abb. 2-3 B*).

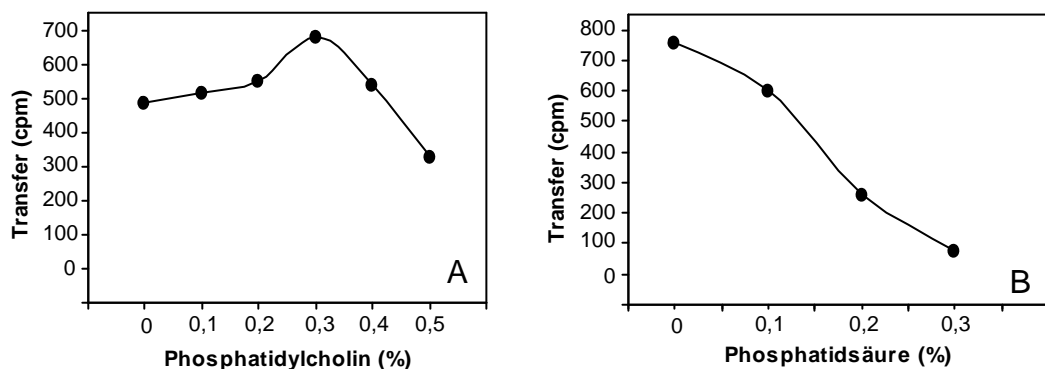


Abb. 2-3: *Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 1,2 % Triton X-100*
Schweinelebermikrosomen wurden in 1,2 % Triton X-100, 50 mM Tris pH 7,2 und 10 mM MnCl₂ gelöst und mit Phosphatidylcholin (A) und Phosphatidsäure (B) in verschiedenen Konzentrationen 60 min inkubiert. Diese Ansätze wurden mit 2000 cpm Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ und 1 mM Akzeptorpeptid auf OST-Aktivität geprüft.

Die Ergebnisse der Messungen mit verschiedenen Phospholipiden in Anwesenheit von 0,1 % Desoxycholol sind in *Abb. 2-4* zusammengefaßt. Wie zu sehen ist, führte hier die Zugabe von Phosphatidylcholin überraschenderweise zu einer deutlichen Abnahme der Glykosylierungsrate (*Abb. 2-4 A*), ebenso die Zugabe von Phosphatidsäure (*Abb. 2-4 B*). In Anwesenheit von 0,1 % Phosphatidylethanolamin hingegen wurde eine Aktivitätssteigerung beobachtet, wobei das Maximum bei etwa 0,15 % dieses Phospholipids lag (*Abb. 2-4 C*).

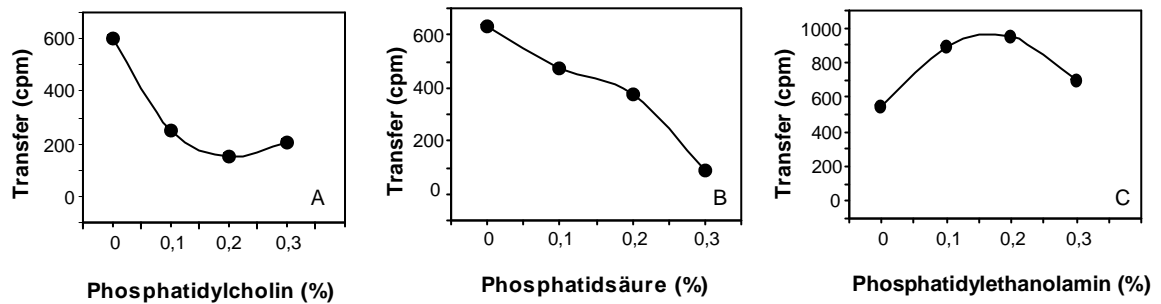


Abb. 2-4: *Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 0,1 % Desoxycholat*

Schweinelebermikrosomen wurden in 0,1 % Desoxycholat, 50 mM Tris pH 7,2 und 10 mM MnCl_2 gelöst und mit Phosphatidylcholin (A), Phosphatidsäure (B) und Phosphatidylethanolamin (C) in verschiedenen Konzentrationen 60 min inkubiert. Diese Ansätze wurden mit 2000 cpm Dol-PP- ^{14}C GlcNAc₂ und 1 mM Akzeptorpeptid auf OST-Aktivität geprüft.

Nach Solubilisierung der Mikrosomen mit 1 % Octylglucosid wurde nach Zugabe von 0,2 % Phosphatidylcholin eine Aktivitätssteigerung von ~30 % (Abb. 2-5 A), nach Zugabe von 0,1 % Phosphatidylethanolamin eine Aktivitätssteigerung von ~20 % (Abb. 2-5 C) gemessen. Im Gegensatz zu den Messungen mit Triton X-100 und Desoxycholat hatte Phosphatidsäure selbst bei hohen Konzentrationen keinen Einfluß auf die OST-Aktivität (Abb. 2-5 B).

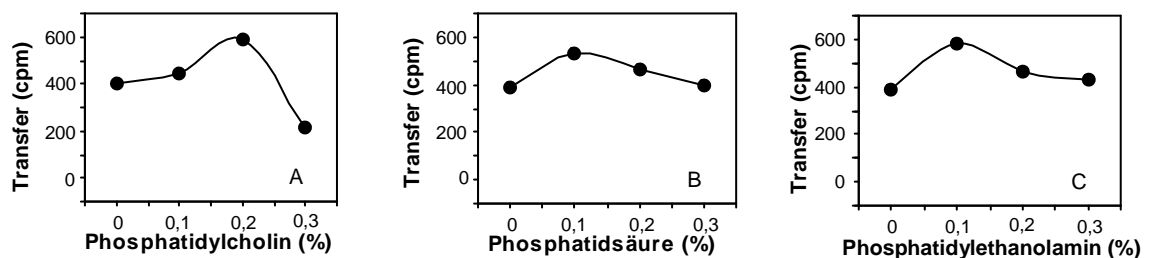


Abb. 2-5: *Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 1 % Octylglucosid*

Schweinelebermikrosomen wurden in 0,1 % Desoxycholat, 50 mM Tris pH 7,2 und 10 mM MnCl_2 solubilisiert, mit Phosphatidylcholin (A), Phosphatidsäure (B) und Phosphatidylethanolamin (C) in verschiedenen Konzentrationen 60 min inkubiert und die OST-Aktivität im Standardassay gemessen.

2.2 Versuche zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der Oligosaccharyltransferase

2.2.1 Hemm-Messungen mit N-Tosyl-L-Lysin-chlormethylketon (TLCK)

Wie von Breuer & Bause (1995) beschrieben, liegt das pH-Optimum der gereinigten OST bei etwa pH 7,0, wobei die Enzymaktivität zu sauren pH-Werten steil abfällt (*Abb. 2-6*).

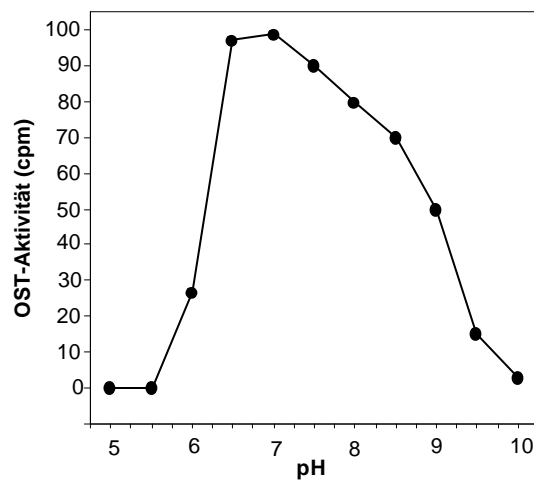


Abb. 2-6: *pH-Abhängigkeit der OST (Breuer & Bause 1995)*
Schweinelebermikrosomen wurden mit Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe (1 mM) und Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ (2000 cpm) inkubiert und die N-Glykosylierung bei den angegebenen pH-Werten ermittelt.

Aufgrund dieses steilen Abfalls wurde vermutet, daß eine Base mit einem pK_s-Wert von ~6 (z. B. Histidin) an der Katalyse beteiligt sein könnte. Um eine mögliche Beteiligung von Histidin an der Katalyse zu überprüfen, wurden Hemm-Messungen mit N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon (TLCK), dessen Struktur in *Abb. 2-7* dargestellt ist, durchgeführt. TLCK ist eine alkylierende Verbindung, von der bekannt ist, daß sie relativ spezifisch mit der Imidazolgruppe von Histidin reagiert.

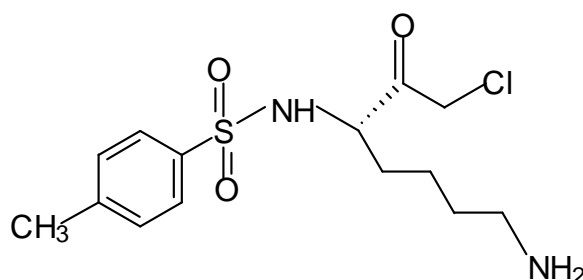


Abb. 2-7: Struktur von N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon

Um den Einfluß von TLCK auf die OST-Aktivität zu messen, wurden Schweinelebermikrosomen in 25 mM Tris/HCl pH 7,2, 1,2 % Triton X-100 und 20 mM MnCl₂ solubilisiert. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von TLCK wurden die Lösungen 30 min bei 25°C vorinkubiert und anschließend die Restaktivität im Standardassay mit Akzeptortripeptid/Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose als Funktion der Zeit gemessen. Zur Kontrolle wurden Messungen mit Schweinelebermikrosomen ohne Zugabe des Inhibitors durchgeführt. Bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeit (100 % Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors) wurde nach Vorinkubation der Schweinelebermikrosomen mit 1 mM TLCK eine etwa 50 % geringere OST-Aktivität gemessen, während in Anwesenheit von 4 mM TLCK ein 80 %iger Aktivitätsverlust zu beobachten war. Nach Vorinkubation mit 10 mM TLCK war praktisch keine Enzymaktivität mehr meßbar (Abb. 2-8).

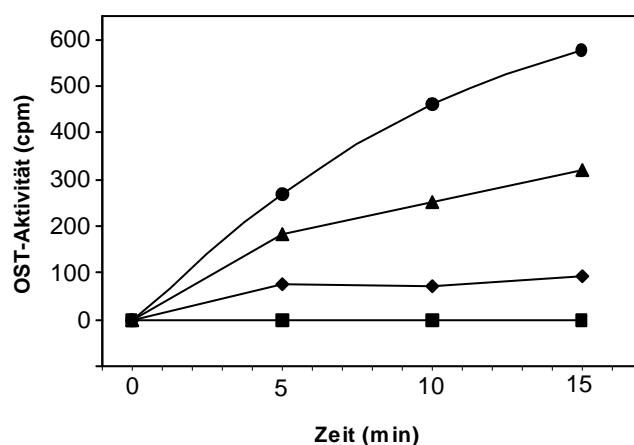


Abb. 2-8: Konzentrationsabhängige Inaktivierung der OST-Aktivität durch TLCK
 Mikrosomen wurden mit (●) 0 mM, (□) 1 mM, (◆) 4 mM und (■) 10 mM TLCK vorinkubiert. Nach 30 min wurde die Restaktivität im Standardassay bestimmt.

Um zu überprüfen, ob der Aktivitätsverlust durch Reaktion von TLCK mit funktionellen Gruppen am aktiven Zentrum erfolgte, wurden Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit des Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe-Standardpeptids (1,4 mM) mit 1 mM bzw. 4 mM TLCK 30 min vorinkubiert und anschließend die Restaktivität im Standardassay gemessen. Wie die Ergebnisse, die in Abb. 2-9 dargestellt sind, zeigen, war bei gleichzeitiger Anwesenheit des Akzeptortripeptids in der Vorinkubation eine deutlich geringere Inaktivierungsrate durch TLCK (1 mM bzw. 4 mM) zu beobachten. Während die Vorinkubation der Schweinelebermikrosomen mit 1 mM TLCK zu einem 50 %igen Aktivitätsverlust führte, wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit des Akzeptortripeptids nur ein etwa 20-30 %iger Aktivitätsverlust beobachtet. Auch nach Vorinkubation der Mikrosomen mit 4 mM TLCK war die Inaktivierungsrate bei gleichzeitiger Anwesenheit des Akzeptortripeptids deutlich geringer.

Aufgrund der Aktivitätsunterschiede, die in An- bzw. Abwesenheit des Akzeptortripeptids in der Vorinkubation gemessen wurden, kann man schließen, daß der Aktivitätsverlust durch TLCK zumindest zu einem beträchtlichen Teil vermutlich durch Reaktion mit Histidinseitenketten am aktiven Zentrum erfolgte. Der vollständige Aktivitätsverlust nach Inkubation mit 10 mM TLCK, der auch durch gleichzeitige Zugabe des Akzeptorpeptids in der Vorinkubation nicht aufgehoben wurde, spricht allerdings dafür, daß die spezifische Reaktion am aktiven Zentrum zumindest teilweise durch unspezifische Alkylierungsreaktionen überlagert wird.

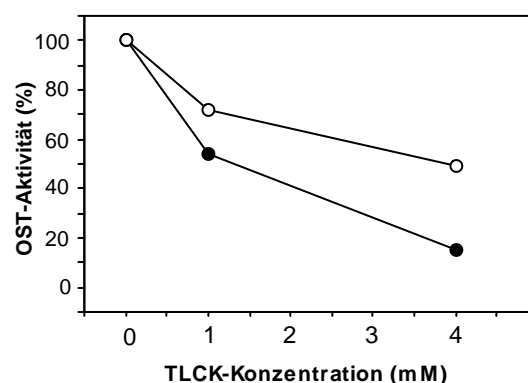


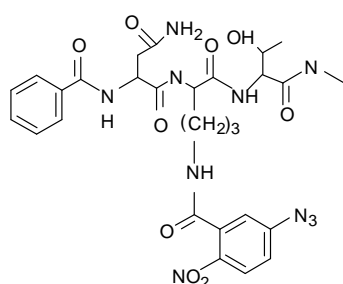
Abb. 2-9: *Hemm-Messungen mit TLCK bei gleichzeitiger Anwesenheit des Standardpeptids*

Mikrosomen wurden mit 0, 1 und 4 mM TLCK in An-(o) und Abwesenheit (•) des Standardpeptid vorinkubiert. Nach 30 min wurde die Restaktivität im Standardassay bestimmt.

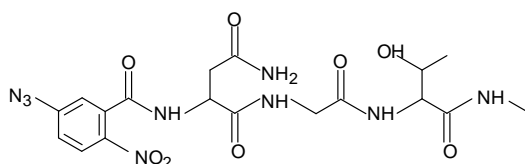
2.2.2 Hemm-Messungen mit photoaktivierbaren Peptiden

Mit dem Ziel, Aminosäuren im aktiven Zentrum der OST zu identifizieren, hatte Bartoschek (2001) im Rahmen seiner Doktorarbeit - ausgehend von dem Standardsubstrat Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe - verschiedene Tripeptidderivate synthetisiert, die in verschiedenen Positionen zur Markersequenz eine photoaktivierbare 5-Azido-2-benzoylgruppe (N_3NO_2Bz) enthielten. Die von ihm durchgeführten Hemmungen zeigten, daß zwei der insgesamt fünf synthetisierten Tripeptidderivate (I: Bz-Asn-Orn(N_3NO_2Bz)-Thr-NHMe; II: N_3NO_2Bz -Asn-Gly-Thr-NHMe Abb. 2-10) zu einer 10-15 %igen Inaktivierung der OST-Aktivität führten. Da mit den anderen Tripeptidderivaten unter gleichen Inkubationsbedingungen kein Aktivitätsverlust zu beobachten war, sprachen diese Ergebnisse für eine spezifische Reaktion von I bzw. II am aktiven Zentrum der OST.

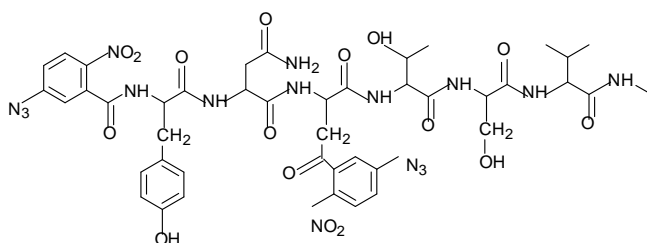
Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in das Hexapeptid Tyr-Asn-Lys-Thr-Ser-Val sowohl am N-Terminus als auch an die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes eine entsprechende 5-Azido-2-benzoylgruppe eingeführt (Abb. 2-10 III).



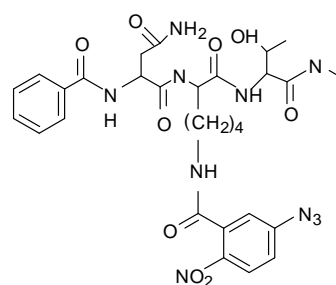
I: Bz-Asn-Orn(N_3NO_2Bz)-Thr-NHMe



II: N_3NO_2Bz -Asn-Gly-Thr-NHMe



III: (N_3NO_2Bz)₂-Tyr-Asn-Lys-Thr-Ser-Val-NHMe



IV: Bz-Asn-Lys(N_3NO_2Bz)-Thr-NHMe

Abb. 2-10: Struktur der photoaktivierbaren Peptide Bz-Asn-Orn(N_3NO_2Bz)-Thr-NHMe (I), N_3NO_2Bz -Asn-Gly-Thr-NHMe (II), Bz-Asn-Lys(N_3NO_2Bz)-Thr-NHMe (IV) (Bartoschek 2001) sowie des diazidobenzoylierten Peptids N_3NO_2 -Tyr-Asn-Lys(N_3NO_2Bz)-Thr-Ser-Val-NHMe (III)*

Ziel dieser Modifikation war es, durch Einbau zweier Azidobenzoylgruppen in vergleichbare Positionen, die im Falle der Tripeptide zu einer Inaktivierung führten, einen Peptidinhibitor mit einem höheren Hemmpotential zu erhalten.

Um eine möglichst spezifische Inaktivierung der OST zu erreichen und die Gefahr unspezifischer Reaktionen zu verringern, sollten die entsprechenden Azidoderivate einen möglichst kleinen K_M -Wert besitzen. Aus diesem Grund wurden zunächst die Bindungseigenschaften für das zweifach azidobenzoylierte Hexapeptid III bestimmt. Hierzu wurden Schweinelebermikrosomen mit steigenden Konzentrationen von III unter Lichtausschluß inkubiert und anschließend dessen Glykosylierung im Standardassay gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in *Abb. 2-11* dargestellt.

Wie die Auswertung nach Lineweaver-Burk (siehe Insert *Abb. 2-11*) zeigt, besitzt das Inhibitorpeptid III einen K_M -Wert von $\sim 120 \mu\text{M}$, der damit deutlich niedriger liegt, als der K_M -Wert des Akzeptortripeptids Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe ($220 \mu\text{M}$).

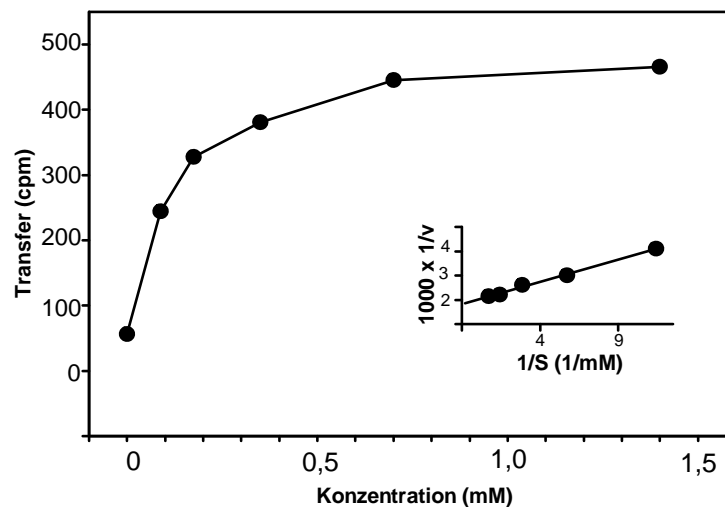


Abb. 2-11: Konzentrationsabhängige Glykosylierung von N_3NO_2Bz -Tyr-Asn-Lys(N_2NO_2Bz)-Thr-Ser-Val-NHMe

Schweinelebermikrosomen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an N_3NO_2Bz -Tyr-Asn-Lys(N_3NO_2Bz)-Thr-Ser-Val-NHMe inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität im Standardassay nach Bause gemessen.

Um die Hemmung der OST durch III zu überprüfen, wurden Schweinelebermikrosomen in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, der 1,5 % Triton X-100, 0,5 M Sucrose und 8 mM $MnCl_2$ enthielt, in Anwesenheit von 0,7 mM III inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden

in Quarzglasküvetten transferiert, diese dann 1 cm vor einer UV-Lampe plaziert und bei 366 nm bestrahlt. Nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten wurden Aliquots entnommen und die OST-Aktivität unter Standardbedingungen mit Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe (2 mM = 10fachen K_M -Wert) und Dol-PP- ^{14}C Chitobiose gemessen. Als Kontrolle wurden entsprechende Messungen unter identischen Inkubations- und Bestrahlungsbedingungen mit Standardakzeptorpeptid (1 mM) in der Vorinkubation bzw. 5-Azido-2-Nitrobenzoesäure (1 mM) sowie den photoaktivierbaren 5-Azido-2-nitrobenzoyltriptiden IV (Bz-Asn-Lys($\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$)-Thr-NHMe; 1 mM) und II ($\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$ -Asn-Gly-Thr-NHMe; 1 mM) durchgeführt.

Wie die in Abb. 2-12 B dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit III bei Bestrahlung zu einer zeitabhängigen Abnahme der OST-Aktivität (~15 % nach 10 min). Eine ähnliche Inaktivierungsrate wurde für das Tripeptid II beobachtet (Abb. 2-12 A), die in der gleichen Größenordnung liegt, wie von Bartoschek (2001) beschrieben.

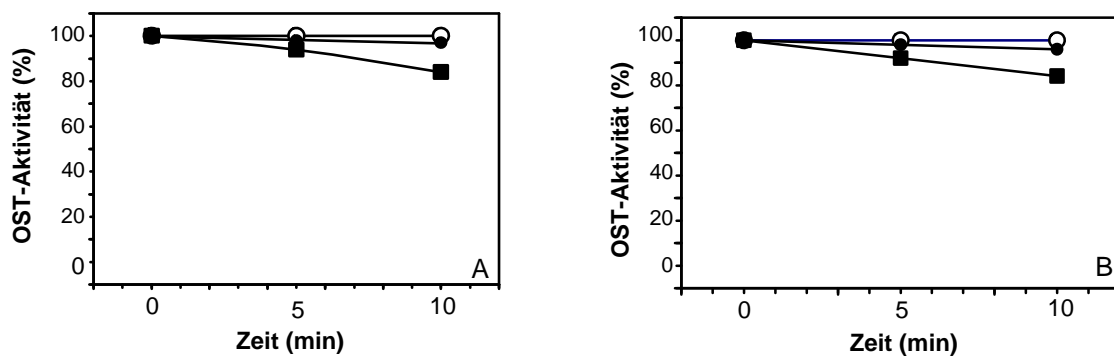


Abb. 2-12: Bestrahlungsexperimente mit Standardakzeptorpeptid, den photoaktivierbaren Peptiden und 5-Azido-2-nitrobenzoesäure

- A) Bestrahlung von Schweinelebermikrosomen in Anwesenheit des Standardpeptids (o), von Bz-Asn-Lys($\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$)-Thr-NHMe (●) bzw. $\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$ -Asn-Gly-Thr-NHMe (■)
- B) Bestrahlung von Schweinelebermikrosomen in Anwesenheit des Standardpeptids (o), Nitrobenzoesäure (●) bzw. $\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$ -Tyr-Asn-Lys($\text{N}_3\text{NO}_2\text{Bz}$)-Thr-Ser-Val-NHMe (■)

Die Transferrate ist jeweils bezogen auf das Standardpeptid (100 % Aktivität) angegeben.

Im Gegensatz hierzu führte die Inkubation der Schweinelebermikrosomen mit 5-Azido-2-nitrobenzoesäure bzw. Derivat IV unter gleichen Bestrahlungsbedingungen zu keinem Aktivitätsverlust (Abb. 2-12 A, B). Die in den Abbildungen dargestellten Werte

wurden auf die Aktivität normiert, die unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit des Standardakzeptorpeptids in der Vorinkubation erhalten wurde (100 %).

Die Beobachtung, daß die Inaktivierungsrate durch das zweifach diazidobenzoylierte Hexapeptid III vergleichbar ist mit der Inaktivierung durch das Tripeptidderivat II, während das Tripeptid IV (anders als das Ornithinderivat I) keine Hemmung zeigte, spricht dafür, daß nur die N-terminale Azidogruppe bzw. die nach Photoaktivierung gebildete Nitrenfunktion mit Gruppen am aktiven Zentrum der OST reagieren kann. Dies bedeutet letztlich, daß durch Einführung zweier Azidobenzoylgruppen in das Hexapeptid dessen Hemmpotential gegenüber den entsprechenden Tripeptidderivaten nicht erhöht wurde. Aufgrund der nur mäßigen Inaktivierungsrate durch III wurde auf weiterführende Experimente (z. B. der Einsatz radioaktiv-markierter Peptidderivate) im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

2.3 Charakterisierung der OST-Untereinheiten

2.3.1 Klonierung von DAD1 aus Schweineherzmuskel

Die Oligosaccharyltransferase aus Schwein wurde von Breuer & Bause (1995) als oligomerer Enzymkomplex isoliert, der als Untereinheiten Ribophorin I, Ribophorin II, OST48 und ein 40 kDa Protein enthielt, wobei das 40 kDa Protein bisher nicht näher charakterisiert wurde. Nicht nachgewiesen im gereinigten OST-Komplex aus Schweineleber wurde DAD1 (defender against apoptotic cell death), ein etwa 12 kDa großes Protein, das von Kelleher & Gilmore (1997) durch Quervernetzungsexperimente als Untereinheit des OST-Komplexes identifiziert wurde. Da davon auszugehen war, daß auch der OST-Komplex aus Schwein DAD1 als Untereinheit enthält, diese Untereinheit aber bei der Reinigung - vermutlich aufgrund seiner geringen Größe und schlechten Anfärbbarkeit in SDS-Gelen - „übersehen“ worden war, sollte versucht werden, DAD1 als Untereinheit des OST-Komplexes nachzuweisen.

Zur Isolierung DAD1 spezifischer Klone wurde eine λ ZAP cDNA-Bank aus Schweineherzmuskel mit einer Sonde gescreent, die durch PCR-Amplifikation unter Verwendung bekannter DNA-Sequenzen von DAD1 aus Mensch hergestellt wurde. Mehrere Screeningrunden lieferten einen DAD1-spezifischen Einzelklon, der 658 bp lang war. Diese 658 bp cDNA-Sequenz enthielt ein 342 bp langes durchgehendes offenes Leseraster

(ORF) zwischen bp 55 und bp 397 Folgende Beobachtungen sprachen dafür, daß diese Basensequenz für die gesamte DAD1-Polypeptidkette kodierte:

- (i) Das 342 bp ORF kodiert für 113 Aminosäuren, entsprechend einem Polypeptid mit einer molekularen Masse von 12,5 kDa. Diese Molmasse entspricht der Molmasse von DAD1 aus Hamster, Mensch (Nakashima et al. 1993) und Hund (Kelleher & Gilmore 1997).
- (ii) Die Annahme, daß das A⁵⁵TG als Starttriplett fungiert, wird durch die Kozak-Sequenz gestützt, nach der Start-ATGs von Adenin- und Guaninbasen der Form CCA/GXX ATG flankiert werden (Kozak 1996).
- (iii) Die Sequenz des 658 bp langen Inserts bzw. die Sequenz innerhalb des ORF zeigt auf Proteinebene eine 98,3 %ige Homologie und auf DNA-Ebene eine Homologie von 92,1 % bzw. 88,6 % zu den entsprechenden Sequenzen von Mensch und Maus.

Die cDNA-Gesamtsequenz des 658 bp Inserts sowie die Aminosäuresequenz, die durch das 342 bp lange offene Leseraster kodiert wird, sind in *Abb. 2-14* dargestellt.

1	GTC TGG TAC TCT AGG AGC TTG GGG TAC GCC GGC CGA AGT ACC AAG TTT ATA GTC	
	Met Ser Ala Ser Val Leu Ser Val Ile Ser Arg Phe Leu Glu Glu Tyr Leu Ser Ser	19
55	ATG TCG GCG TCG GTG TTG TCG GTA ATC TCC CGG TTC TTA GAA GAG TAC TTG AGC TCC	
	Thr Pro Gln Arg Leu Lys Leu Leu <u>Asp Ala Tyr Leu Leu Tyr Ile Leu Leu Thr Gly</u>	38
112	ACT CCT CAG CGT CTG AAA TTG TTG GAT GCA TAT CTC TTG TAT ATA CTG CTG ACC GGG	
	<u>Ala Leu Gln Phe Gly Thr Cys Leu Leu Val Gly Thr Phe Pro Phe Asn Ser Phe Leu</u>	57
169	GCG CTG CAA TTC GGT TAC TGT CTC CTC GTG GGG ACC TTC CCC TTC AAC TCT TTC CTC	
	<u>Ser Gly Phe Ile Ser Cys Val Gly Ser Phe Ile Leu Ala Val Cys Leu Arg Ile Gln</u>	76
226	TCC GGC TTT ATC TCT TGC GTG GGG AGC TTC ATT CTA GCG GTG TGT CTG AGA ATA CAG	
	Ile Asn Pro Gln Asn Lys Ala Asp Phe Gln Gly Ile Ser Pro Glu Arg Ala Phe Ala	95
283	ATC AAC CCG CAG AAC AAA GCA GAT TTC CAA GGC ATC TCC CCA GAG CGA GCC TTT GCT	
	Asp Phe Leu Phe Ala Ser Thr Ile Gln His Leu Val Val Met Asn Phe Val Gly *	114
340	GAT TTT CTC TTT GCC AGC ACC ATC CAG CAC CTC GTT GTC ATG AAC TTT GTT GGC TGA	
397	ATC ATT CCC GTT TAC TTA ATT GGG GAG AAG GAG ACT AGA AGA AGG TTC ACT CTG ATT	
454	TCC CCT GGA CAA GAG CTC TTA AGA TGG CAG TTT GCT GGA CAC ATG GAT TTT CTT CAG	
511	ATT TAT GCT TAC TAC CAC TCT GAT TGT ACA GAG CCC AGA AAA GTC CCG CGG CTT CTG	
568	ACT CAG AAT AAC TTT GTA ACT TCG TAC TGG TCA TTT ATT AAT ACA GTC TTT GCC TCG	
625	CAT TAA ATG TAA CCT TTT GGC CTT CCA GAT TAA A	

Abb. 2-13: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von DAD1 aus Schweineherzmuskel
Basen sind links, Aminosäuren rechts angegeben. Potentielle Transmembran-
domänen sind unterstrichen.

Wie die Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte & Doolittle (1982) zeigte, enthält die DAD1-Polypeptidkette mehrere stark hydrophobe Sequenzbereiche, die als potentielle Transmembrandomänen dienen können (*Abb. 2-14*). Literaturdaten sprechen in der Tat dafür, daß zwei dieser hydrophoben Bereiche (in *Abb. 2-13* unterstrichen) als Transmembrandomäne dienen, wobei N- und C-Terminus auf der cytosolischen Seite liegen sollen, d. h. daß es sich bei DAD1 um ein Typ IV Transmembranprotein handelt (Makishima et al. 1997).

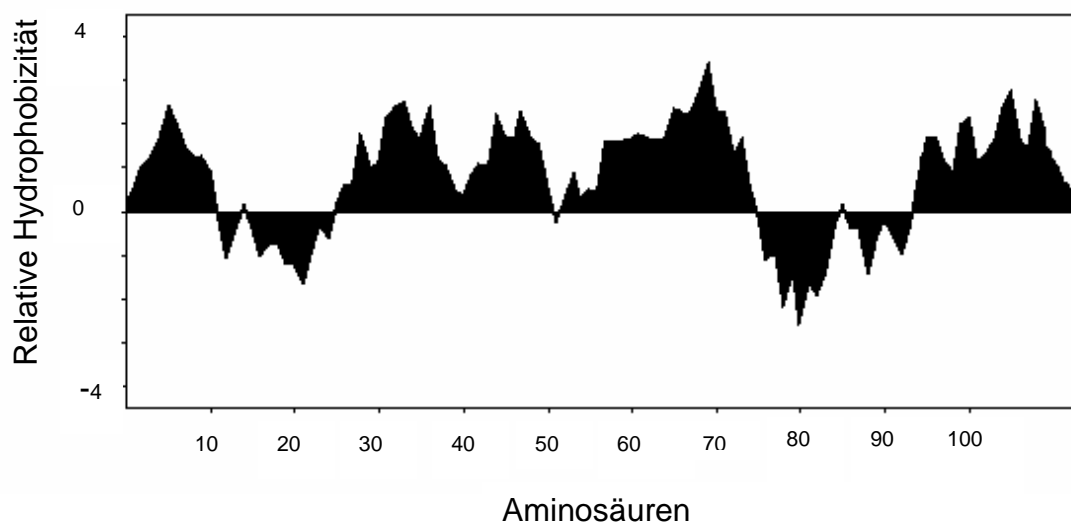


Abb. 2-14: *Hydrophobizitätsanalyse von DAD1 nach Kyte & Doolittle (1982)*
Es wurde das gesamte offene Leseraster von DAD1 berechnet. Die Fenstergröße betrug 7 Aminosäuren

Die abgeleitete Aminosäuresequenz enthält keine Triplettsequenz vom Typ Asn-Xaa-Thr/Ser, was eine N-Glykosylierung von DAD1 ausschließt. Ebenso enthält DAD1 keines der bekannten ER-Lokalisationssignale, wie sie bei Typ I-Transmembranproteinen am C-Terminus (Doppel-Lysin-Motiv) oder bei Typ II-Transmembranproteinen am N-Terminus nachgewiesen wurde (Schutze et al. 1994).

2.3.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das DAD1-Gesamtprotein

Da ausreichende Mengen des DAD1-Proteins zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, der als analytische Sonde eingesetzt werden sollte, durch herkömmliche Rei-

nigung aus Schweineleber nicht zu gewinnen waren, wurde versucht DAD1 in *E. coli* zu exprimieren. Parallel hierzu wurde die Firma Pineda beauftragt, Antikörper gegen bestimmte Teilpeptide von DAD1, die auf chemischen Weg synthetisiert wurden, herzustellen.

2.3.2.1 Expression von DAD1 in *E. coli*

Für die Synthese in *E. coli* wurde die DAD1-spezifische cDNA nach Einführung einer His₆-tag-Markierung am C-Terminus der kodierenden Sequenz in den *E. coli* spezifischen Expressionsvektor pQE30 (Fa. Qiagen) einkloniert und die Zellen dann mit diesem Vektorkonstrukt transformiert. Nach Induktion der transformierten Zellen mit IPTG wurden jedoch, wie durch Immunoblotanalyse mit *E. coli* Extrakten unter Verwendung eines anti-(His)-Antikörpers gezeigt wurde, nur äußerst geringe Mengen des His₆-getaggten DAD1-Proteins synthetisiert. Die Syntheserate konnte auch durch Modifikation der Kultivierungsbedingungen nicht gesteigert werden. Dies überrascht nicht, da ähnlich negative Ergebnisse in der Literatur auch für die Synthese anderer Membranproteine in *E. coli* mehrfach beschrieben wurden (Rogl et al. 1998; Zhou & Singh 2004). Aufgrund der geringen Expressionsrate des His-getaggten DAD1-Proteins wurde deshalb ein alternativer Weg gewählt und ein Vektor konstruiert, der für ein Fusionsprotein, bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST) und DAD1, kodierte. GST-haltige Fusionsproteine sind in der Regel gut löslich und können zudem über Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion leicht isoliert und gereinigt werden. Zur Herstellung der GST-DAD1-Vektorkonstruktes wurde die DAD1-cDNA über BamHI- und EcoRI-Schnittstellen, die über PCR eingeführt wurden, in den Vektor pGEX-4T1 (Fa. Pharmacia), der die GST-spezifische Sequenz bereits enthielt, einkloniert. Dieser pGEX-4T1-Vektor enthält zudem einen tac-Promotor, was eine Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG erlaubt. Der GST-DAD1-spezifische Vektor (GST-DAD1) wurde dann zur Transformation von *E. coli* BL21 eingesetzt. Wie Abb. 2-15 zeigt, wurden nach Induktion mit IPTG beträchtliche Mengen eines 38 kDa großen Hybridproteins synthetisiert, dessen Molmasse dem erwarteten Wert des Fusionsproteins (GST 26 kDa, DAD1 12 kDa) entsprach.

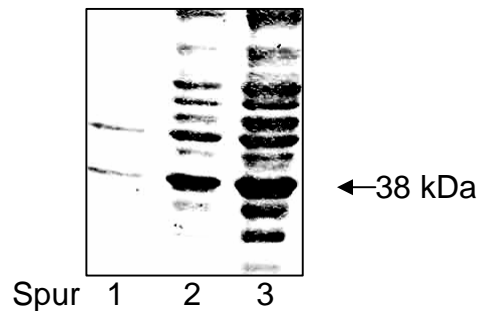


Abb. 2-15: *SDS-PAGE der Zellsuspensionen vor und nach Induktion mit IPTG*
 Aliquots der Zellsuspensionen wurden in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt. Spur 1: vor Induktion, Spur 2: 2 h nach Induktion, Spur 3: 5 h nach Induktion

2.3.2.2 Aufreinigung und Spaltung des Fusionsproteins

Zur Reinigung des exprimierten Fusionsproteins wurden transformierte *E. coli* Zellen (1 l Kultur) 5 h nach Induktion mit IPTG geerntet und mit 1 % Triton X-100 in PBS aufgeschlossen. Der nach Ultraschallbehandlung erhaltene Zellextrakt wurde mit Glutathion-S-Sepharose versetzt und die Suspension 12 h bei 4°C gerührt. Anschließend wurde das Affinitätsharz abgetrennt, in eine Säule überführt und mehrmals mit kaltem PBS gewaschen. Die Elution des GST-DAD1-Fusionsproteins erfolgte dann mit 10 mM reduziertem Glutathion in 200 mM Tris/HCl, pH 8.

Am 5' Ende der GST-Sequenz, an die das 3' Ende der DAD1-cDNA in frame ligiert wurde, befindet sich eine sogenannte „linker Region“, die für eine Thrombin-Erkennungssequenz kodiert. Diese erlaubt es, das GST-DAD1-Fusionsprotein mit Thrombin spezifisch in GST und DAD1 zu spalten. Hierzu wurde das affinitätsgereinigte Fusionsprotein mit Thrombin (10 U/mg Protein) versetzt, der Ansatz 2 h gerührt, anschließend das freigesetzte DAD1 durch präparative SDS-PAGE vom GST-Anteil abgetrennt.

2.3.2.3 Immunisierung von Kaninchen

Nach Anfärbung des präparativen SDS-Gels mit Coomassie-Blau wurde der entsprechende Bereich des Gels, der das DAD1-Protein enthielt, ausgeschnitten. Ein Teil der

Gelbade wurde anschließend mit PBS und dem gleichen Volumen kompletten Freund'schen Adjuvans versetzt, die Suspension im Ultraschall homogenisiert und diese dann zwei Kaninchen subkutan injiziert. Durch weitere Injektionen des Antigens in inkompletten Freund'schen Adjuvans in Abständen von 2 Wochen (insgesamt 5 mal) wurde die Immunantwort stimuliert, wobei vor jeder neuen Immunisierung Blutproben entnommen wurden, die nach entsprechender Aufarbeitung für Immunoblotanalysen eingesetzt wurden (siehe Experimenteller Teil). Zur Überprüfung der Antikörperbildung diente zum einen das GST-DAD1-Fusionsprotein als Antigen, zum anderen DAD1, das nach Thrombinspaltung aus GST-DAD1 freigesetzt wurde. Die Ergebnisse der Immunoblotanalysen zeigten, daß in beiden Kaninchen nur eine äußerst schwache Immunantwort gegen DAD1 erhalten wurde, so daß die verschiedenen Seren aufgrund des nur geringen Antikörpertiters zum Nachweis von DAD1 praktisch unbrauchbar waren.

2.3.3 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen DAD1-spezifische Peptide

Aufgrund der schwachen Immunantwort, die in beiden Kaninchen gegen das DAD1-Gesamtprotein erhalten wurde, wurden als alternativer Ansatz Antikörper gegen kürzere Peptide der DAD1-Polypeptidkette hergestellt. Hierzu wurden zunächst geeignete Peptidsequenzen, die aufgrund von Erfahrungswerten eine größtmögliche Immunantwort erwarten lassen, durch Proteinepitop-Analyse ermittelt. Aus den vorliegenden Informationen wurden zwei Peptidsequenzen ausgewählt, von denen eine im N-terminalen und eine andere im C-terminalen Bereich der DAD1-Polypeptidkette lagen (*Abb. 2-16*). Die Proteinepitop-Analyse, die Synthese der beiden Peptide und deren Kopplung an Keyhole limpet haemocyanin (KLH) ebenso wie die Antikörperherstellung und -reinigung wurden von der Firma Pineda Antikörperservice durchgeführt.

Peptid 1: RFLEEYLSSTPQRLKLLD (N-Terminus)

Peptid 2: QNKADFQGISPERAFAD (C-Terminus)

Abb. 2-16: Sequenzen der synthetisierten Peptide, die zur Antikörpergewinnung benutzt wurden

Immunisiert wurden pro Peptid jeweils drei Kaninchen, wobei insgesamt 6 Boostinjektionen gesetzt wurden. Die Immunantwort nach 61, 90 und 120 Tagen wurde durch Immunoblotanalyse unter Verwendung von GST-DAD1 als Antigen getestet. Zudem wurde der Antikörpertiter nach jedem Boost durch ELISA bestimmt. Das Ergebnis einer entsprechenden ELISA-Analyse mit Seren eines Kaninchens, die nach Immunisierung mit dem C-terminalen Peptid erhalten wurden, ist in *Abb. 2-17* dargestellt. Wie zu sehen, ist bereits nach dem 2. Boost eine Antikörperbildung nachweisbar. Nach dem 6. Boost ergab sich ein Titer von 1:400. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den Seren der beiden Kaninchen, die mit dem gleichen C-terminalen Peptid als Antigen immunisiert wurden, erhalten. Im Gegensatz hierzu führte die Immunisierung der drei Kaninchen mit dem N-terminalen Peptid von DAD1 zu einer deutlich schwächeren Immunantwort.

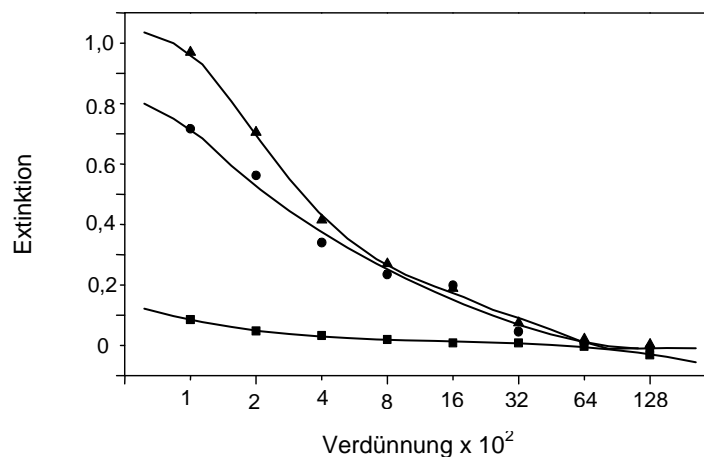


Abb. 2-17: ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration im Kaninchenserum
 ■=Präimmunserum, ●= 2. Boost, ▲=6. Boost

Der Antikörper gegen das C-terminale Peptid wurde aus dem Serum des Kaninchens, das nach dem 6. Boost den höchsten Titer aufwies, durch Affinitätschromatographie gereinigt. Der affinitätsgereinigte Antikörper wurde anschließend durch Immunoblotanalyse überprüft. Ein typischer Immunoblot mit GST-DAD1 (vor und nach Thrombinspaltung) als Antigen ist in *Abb. 2-18* dargestellt. Wie zu sehen ist, erkennt der affinitätsgereinigte Antikörper sowohl GST-DAD1 (38 kDa) als auch das durch Thrombin abgespaltene DAD1-Protein (12 kDa).

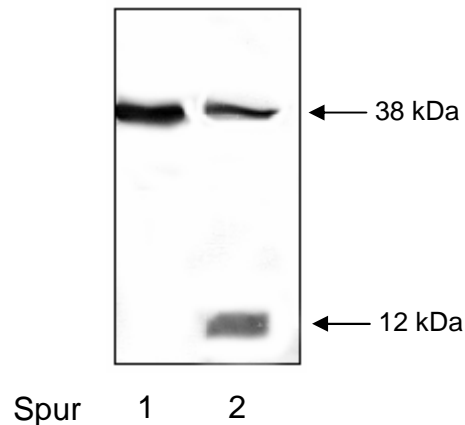


Abb. 2-18: Immunoblot mit einem gegen den C-terminalen Bereich von DAD1 gerichteten affinitätsgereinigtem Antikörper
 Aliquots des GST-DAD1 Fusionsproteins vor und nach partieller Spaltung mit Thrombin wurde in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit dem anti-DAD1-Antikörper inkubiert.

Um die Spezifität des affinitätsgereinigten Antikörpers zusätzlich zu überprüfen, wurde eine Immunoblotanalyse mit Extrakten von Schweinelebermikrosomen bzw. mit einer OST-Fraktion, die durch ConA Behandlung aus solubilisierten Schweinelebermikrosomen erhalten wurde, durchgeführt. Wie Abb. 2-19 zeigt, detektierte der Antikörper in den eingesetzten Extrakten (Spur 2+3) spezifisch ein 12 kDa großes Protein, das mit Präimmunserum (Spur 1) nicht nachweisbar war. Eine besonders starke Anfärbung im ConA-Präzipitat (Spur 3) überrascht nicht, da, wie Arbeiten von Breuer & Bause (1995) gezeigt haben, der OST-Komplex durch Ausfällen mit ConA stark angereichert werden kann.

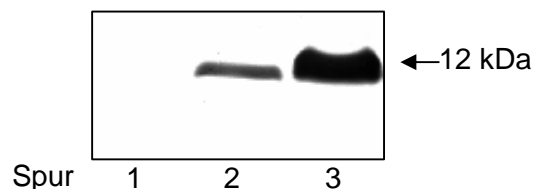


Abb. 2-19: Nachweis von DAD1 in Schweinelebermikrosomen
 Schweinelebermikrosomen bzw. eine nach ConA Behandlung erhaltene OST-Fraktion wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Präimmunserum (Spur 1) bzw. dem affinitätsgereinigtem anti-(DAD1)-Antikörper (Spur 2+3) inkubiert. Spur 1+2: rohe Schweinelebermikrosomen; Spur 3: ConA-Präzipitat

Die Ergebnisse in *Abb. 2-19* zeigen, daß der gegen das C-terminale Peptid gerichtete Antikörper selbst in mikrosomalen Extrakten das 12 kDa DAD1-Protein spezifisch erkennt und sich somit als analytische Sonde eignet.

2.3.4 Expression von DAD1 in COS 1-Zellen

Um DAD1 näher zu charakterisieren wurde zunächst versucht, das Protein in COS 1-Zellen zu synthetisieren. Hierzu wurde die DAD1-spezifische-cDNA in den pcDNA3-Vektor inkloniert und COS 1-Zellen anschließend mit diesem Vektorkonstrukt nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Als Kontrolle dienten COS 1-Zellen, die mit dem pcDNA3-Leervektor transfiziert wurden. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, in Lysispuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1 % Triton X-100, 1 M Sucrose und 0,5 M NaAc) aufgenommen und Aliquots der Zellextrakte durch SDS-PAGE/Immunoblotting analysiert. Die Versuche, die mehrfach und unter Variation der Reaktionsbedingungen wiederholt wurden, zeigten, daß unter Verwendung des anti-(DAD1)-Antikörpers als analytische Sonde in den Zellextrakten kein Protein mit der Molmasse von 10-12 kDa nachweisbar war. Ähnlich negative Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn zur Transfektion von COS 1-Zellen ein Vektorkonstrukt eingesetzt wurde, das die cDNA für ein am N- bzw. C-Terminus myc-getaggtetes DAD1-Protein enthielt. Auch in diesem Falle konnte weder mit dem anti-(DAD1)-Antikörper noch mit dem anti-(myc)-Antikörper eine Überexpression von DAD1 nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sprachen dafür, daß sowohl DAD1 (Wildtyp) als auch die myc-getaggteten Formen des Proteins in COS 1-Zellen nicht bzw. äußerst schlecht überexprimiert werden. Wie die im Kap. 2.3.2.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, wurde im *E. coli* System, im Gegensatz zu DAD1 bzw. His₆-DAD1, ein Fusionsprotein bestehend aus GST und DAD1 stark überexprimiert. Da bekannt war, daß sich GFP (green fluorescent protein) in COS 1-Zellen erfolgreich überexprimieren läßt, wurde deshalb ein Vektor konstruiert, der für ein DAD1-GFP-Fusionsprotein kodiert (pSVSportDAD1-GFP; s. Anhang). Transfektion der COS 1-Zellen mit diesem Vektorkonstrukt und Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Wie die Ergebnisse der Immunoblotanalyse, die in *Abb. 2-20* dargestellt sind, zeigen, detektiert sowohl der anti-(GFP)-Antikörper (Spur 4) als auch der anti-(DAD1)-Antikörper (Spur 2) spezifisch ein Protein mit der Molmasse von ~41 kDa (GFP 29 kDa, DAD1 12 kDa), das in Kontrollzellen (Spur 1 bzw. 3) nicht nachweisbar ist. Dies bedeutet, daß im Gegensatz zum DAD1-Wildtyp-

protein, das DAD1-GFP-Fusionsprotein in COS 1-Zellen stark überexprimiert wird. Der Grund für die starke Überexpression des DAD1-GFP-Fusionsproteins im Vergleich zu der praktisch nicht nachweisbaren Synthese des DAD1-Wildtypproteins ist unklar. Es ist denkbar, daß sich die starke Hydrophobizität des DAD1-Proteins ungünstig auf die Expression in COS 1-Zellen auswirkt.

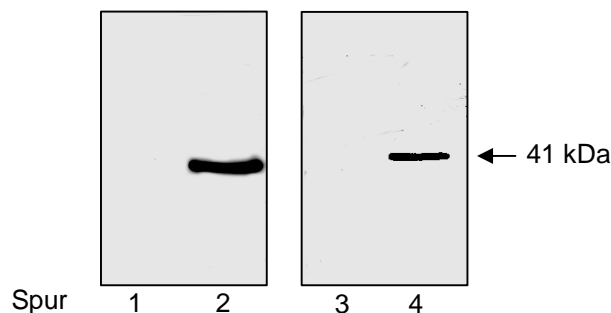


Abb. 2-20: Immunoblotanalyse von pSVSport.1DAD1-GFP transfizierten COS 1-Zellen
Solubilisiertes Protein aus COS 1-Zellen wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit dem anti-(DAD1)-Antikörper (Spuren 1+2) bzw. einem anti-(GFP)-Antikörper (Spuren 3+4) inkubiert. Spur 1+3: Kontrollzellen (Leervektor), Spur 2+4: mit DAD1-GFP transfizierte COS 1-Zellen

2.3.5 DAD1-GFP wird als ER-residentes Fusionsprotein exprimiert

Die OST-Untereinheiten OST48, Ribophorin I und Ribophorin II sind Typ I-Membranproteine, die, wie durch Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, in COS 1-Zellen als ER Proteine exprimiert werden. Im Gegensatz zu der OST48-Untereinheit, die eine typische Di-Lysin-Sequenz in der cytosolischen Domäne enthält, die als ER-Retrieval-Motiv fungieren kann (Hardt et al. 2001), fehlen in der Polypeptidkette von Ribophorin I und Ribophorin II vergleichbare Lokalisationssignale. Koexpressionsstudien zeigten allerdings, daß das Di-Lysin-Motiv für die ER-Lokalisation von OST48 nicht essentiell ist und daß OST48 durch Wechselwirkung mit Ribophorin I im ER zurückgehalten wird (Fu & Kreibich 2000, Hardt et al. 2001). Auch DAD1 enthält keines der bekannten Lokalisationssignale. Um die subzelluläre Lokalisation von DAD1 zu bestimmen, wurden COS 1-Zellen mit dem spezifischen DAD1-GFP-Vektorkonstrukt transfiziert. Als Kontrolle dienten COS 1-Zellen, die mit einem entsprechenden Vektor

transfiziert wurden, der ausschließlich die GFP-cDNA (pSVSport.1-GFP) enthielt. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert, unspezifische Bindungsstellen mit Ovalbumin abgesättigt und die Zellen dann in Mowiol/DABCO eingebettet. Nachdem die Zellen 15 h bei 4°C gelagert worden waren, wurden sie im Epifluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Wie in *Abb. 2-21 B* dargestellt, weisen COS 1-Zellen, die das DAD1-GFP-Fusionsprotein überexprimieren, eine starke Fluoreszenzmarkierung in Bereichen auf, die typisch für das Membransystem des Endoplasmatischen Retikulums sind. Dieses Pattern unterscheidet sich deutlich von dem, das nach Expression von GFP erhalten wurde (*Abb. 2-21 A*), von dem bekannt ist, daß es als cytosolisches Protein synthetisiert wird. Aus diesen Ergebnisse kann man schließen, daß die DAD1-Untereinheit in COS 1-Zellen als ER-residentes Protein synthetisiert wird, und daß die entsprechende Strukturinformation für die ER-Lokalisation von DAD1-GFP in der DAD1-Polypeptidkette enthalten sein muß.

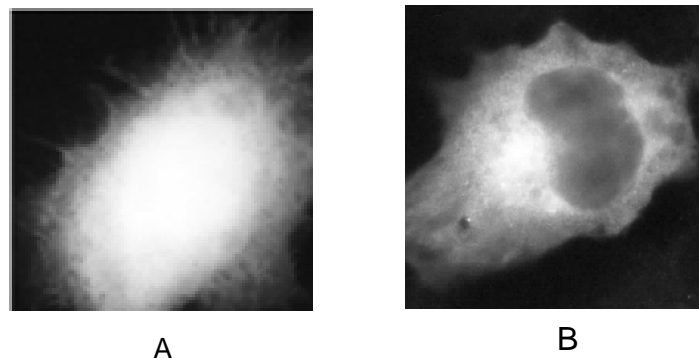


Abb. 2-21: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von DAD1-GFP transfizierten COS1-Zellen
Bild A: mit Leervektor (pSVSport.1-GFP) transfizierte Zellen, Bild B: mit DAD1-GFP transfizierte Zellen

2.3.6 Charakterisierung von OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 nach Expression in COS 1-Zellen

2.3.6.1 Expression der einzelnen Untereinheiten

Die spezifische Funktion der Untereinheiten (OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1) im membrangebundenen OST-Komplex ist in wesentlichen Punkten noch unverstanden. Um Hinweise darauf zu erhalten, ob und welche dieser OST-Unterein-

heiten an der Katalyse beteiligt sind, wurden OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 in COS 1-Zellen exprimiert und die entsprechend überexprimierten Untereinheiten auf ihre katalytische Aktivität überprüft. Zur Expression von OST48, Ribophorin I und Ribophorin II dienten die Vektorkonstrukte pCMV-OST48, pCMV-RI-myc bzw. pCMV-RII-myc, bei denen die cDNAs, die für die entsprechenden Untereinheiten kodieren, in den pcDNA3-Vektor inkloniert worden waren. Im Falle von Ribophorin I und Ribophorin II wurde jeweils eine myc-spezifische Sequenz an das 3' Ende (C-Terminus) angeheftet. Dies erlaubte es, endogene und überexprimierte Formen dieser beiden Proteine immunologisch nebeneinander nachzuweisen. Die entsprechenden Vektorkonstrukte wurden freundlicherweise von Frau Dr. Birgit Hardt zur Verfügung gestellt. DAD1 wurde unter Verwendung des pSVSportDAD1-GFP-Vektors (s. Kap. 2.3.4) als Fusionsprotein überexprimiert. Nach Transfektion wurden die COS 1-Zellen 48 h kultiviert, anschließend geerntet, das Zellpellet in Lysispuffer (1 % Triton X-100, 1 M Sucrose, 0,5 M NaAc in 100 mM Tris/HCl, pH 7,2) aufgenommen und Aliquots der jeweiligen Detergenzextrakte für Immunoblotanalysen und OST-Aktivitätsmessungen eingesetzt. Wie die Ergebnisse der Immunoblotanalyse in der *Abb. 2-22 A* zeigen, erkennt der anti-(OST48)-Antikörper in Kontrollzellen (Spur 1) ein ~48 kDa großes Protein, das offensichtlich der endogenen OST48-Untereinheit entspricht. Nach Transfektion der Zellen mit dem OST48-spezifischen Vektor wird diese Bande deutlich intensiver (Spur 2). Im Falle der mit pCMV-RI-myc (*Abb. 2-22 B* Spur 2) bzw. mit pCMV-RII-myc (*Abb. 2-22 C* Spur 2) transfizierten Zellen detektierte der anti-(myc)-Antikörper ein ~70 kDa bzw. ein ~65 kDa großes Protein. Beide Proteine waren in Kontrollzellen nicht nachweisbar (*Abb. 2-22 B, C* Spur 1), so daß davon auszugehen ist, daß es sich bei diesen Proteinen um Ribophorin I-myc bzw. Ribophorin II-myc handelt. Nach Transfektion der COS 1-Zellen mit pSVSportDAD1-GFP wurde eine Bande bei 41 kDa durch den anti-(DAD1)-Antikörper angefärbt, deren Molmasse der Molmasse des DAD1-GFP-Fusionsproteins entsprach (*Abb. 2-22 D*). Die Ergebnisse der Immunoblotanalysen zeigen somit, daß alle vier Untereinheiten in den COS 1-Zellen effektiv überexprimiert werden.

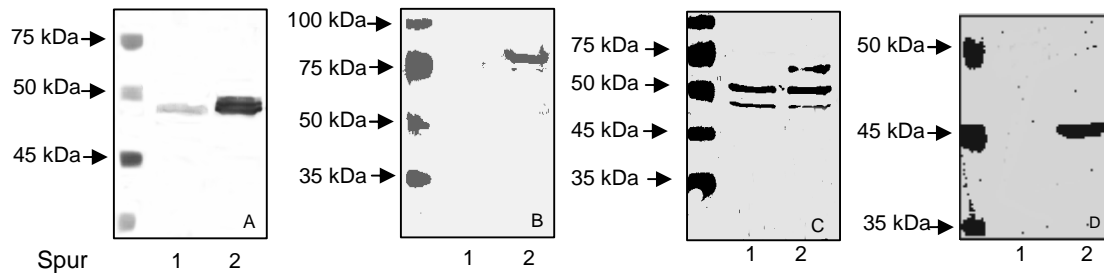


Abb. 2-22: *Immunoblotanalyse transfizierter COS 1-Zellen*

Solubilisiertes Protein aus COS 1-Zellen wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. A.) mit pCMV-OST48 transfizierte Zellen, B.) mit pCMV-RI-myc transfizierte Zellen, C.) mit pCMV-RII-myc transfizierte Zellen, D.) mit pSVSportDAD1-GFP transfizierte Zellen

Um zu überprüfen, ob die überexprimierten OST-Untereinheiten katalytisch aktiv sind, wurden Aliquots der jeweiligen Detergenzextrakte mit Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose als Glykosyldonor und dem Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe-Tripeptid als Akzeptor unter Standardbedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden nach 0, 5, 10 und 15 min mit Methanol abgestoppt und die OST-Aktivität, wie im Experimentellen Teil beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in *Abb. 2-23* zusammengefaßt und zeigen, daß weder die Überexpression von OST48 (*Abb. 2-23 A*) noch die Überexpression von Ribophorin I (*Abb. 2-23 B*) und Ribophorin II (*Abb. 2-23 C*) zu einer über dem endogenen Spiegel liegenden OST-Aktivität führte. Nach Überexpression des GFP-DAD1-Fusionsproteins wurde in einigen Experimenten eine geringfügig höhere OST-Aktivität verglichen mit schein-transfizierten Zellen (Kontrolle) beobachtet. Insgesamt gesehen zeigen diese orientierenden Experimente, daß weder OST48 noch Ribophorin I und Ribophorin II (und vermutlich auch DAD1) - als einzelne Untereinheiten überexprimiert - katalytische Aktivität aufweisen.

Zur Absicherung der in *Abb. 2-23* dargestellten Messungen wurden die entsprechenden Experimente mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in *Tabelle 1* zusammengefaßt. Die angegebenen Werte für die OST-Aktivität nach Überexpression stellen Mittelwerte dar, die auf die Aktivität = 1 in Kontrollzellen normiert wurden.

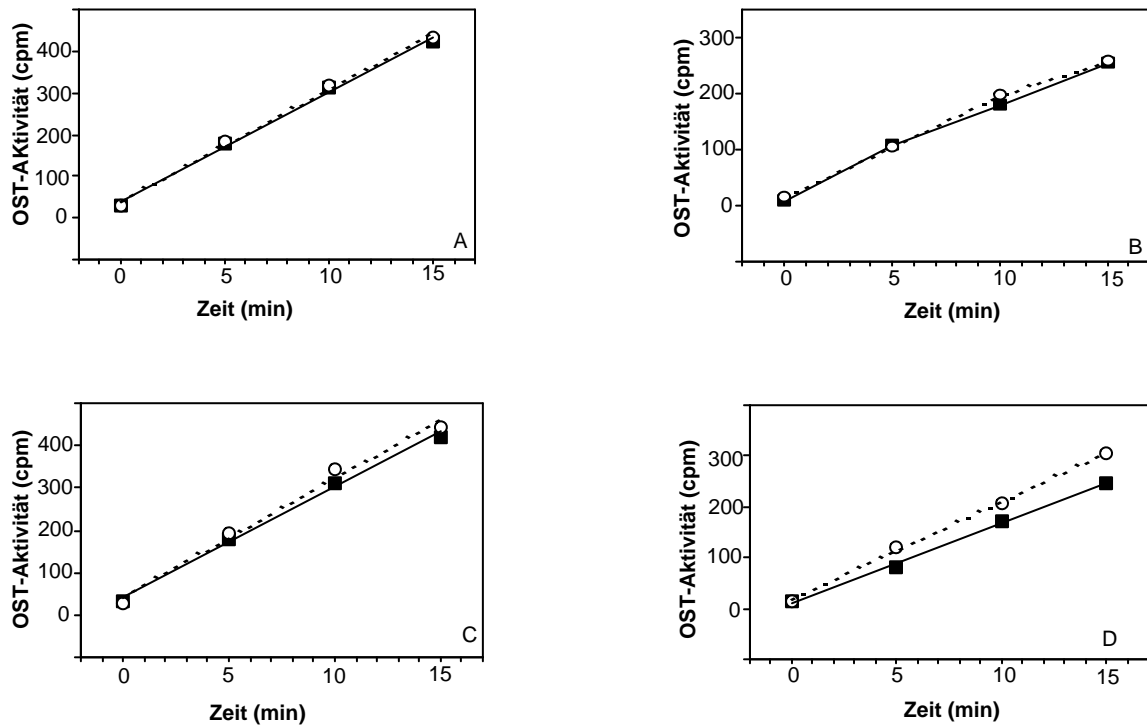


Abb. 2-23: Messung der Enzymaktivität der Oligosaccharyltransferase von transfizierten COS 1-Zellen

Von den verschiedenen Transfektionsansätzen wurden ca. 100 µg Protein/Messung eingesetzt. Die Aliquots wurden mit Dol-PP- $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_2$ und Standardpeptid inkubiert, die Reaktionen nach 0, 5, 10 und 15 min mit Methanol abgestoppt und wie im Experimentellen Teil beschrieben aufgearbeitet. ■ -mit pcDNA3 transfizierte Zellen; o -mit pCMV-OST48 (A), pCMV-RI-myc (B), pCMV-RII-myc (C) und pSVSportDAD1-GFP (D) transfizierte Zellen.

Wie den Werten für die einzelnen Untereinheiten zu entnehmen ist, sind die OST-Aktivitäten, die in den verschiedenen Zellextrakten gemessen wurden - unabhängig davon, ob OST48, Ribophorin I oder Ribophorin II überexprimiert wurden - praktisch identisch mit der OST-Aktivität in Kontrollzellen. Nach Überexpression von DAD1 (als Fusionsprotein) wurde, wie in *Abb. 2-23 D* zu erkennen, ein leichter Anstieg der OST-Aktivität beobachtet. Der aus mehreren Experimenten erhaltene Mittelwert von 1,12 (*Tabelle 1*) deutet darauf hin, daß der in *Abb. 2-23 D* beobachtete 10 %ige Anstieg der OST-Aktivität in der Tat reproduzierbar zu sein scheint.

Tab. 1: *Glykosylierung des Standardpeptids nach Expression von OST48 und RI-myc, RII-myc und DAD1-GFP in COS 1-Zellen*
Die katalytische Aktivität wurde auf 1,0 (Kontrollzellen) normiert; die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von jeweils fünf unabhängigen Ergebnissen dar.

COS1-Zellen transfiziert mit	Relative Erhöhung der katalytischen Aktivität
pcDNA3	1,00
pCMV-OST48	1,04
pCMV-RI-myc	1,03
pCMV-II-myc	1,03
pSVSportDAD1-GFP	1,12

2.3.6.2 Koexpression verschiedener OST-Untereinheiten

Arbeiten von Breuer & Bause (1995) hatten gezeigt, daß sich durch ConA-Präzipitation aus dem gereinigten OST-Komplex aus Schweineleber eine katalytisch aktive Fraktion abtrennen ließ, die ausschließlich OST48 und Ribophorin I enthielt. Dies spricht dafür, daß diese beiden Untereinheiten für die Katalyse verantwortlich bzw. essentiell sind. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden deshalb OST48 und Ribophorin I in COS 1-Zellen gemeinsam überexprimiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Vektorkonstrukt transfiziert, das sowohl die cDNA von OST48 als auch die cDNA von Ribophorin I-myc enthielt. Durch Verwendung dieses „Doppelvektors“ (pCMV-OST48-RI-myc) sollte sichergestellt werden, daß OST48 und Ribophorin I in der gleichen Zelle überexprimiert werden. Die erfolgreiche Transfektion und Überexpression beider Untereinheiten wurde zunächst durch Immunoblotanalyse überprüft (*Abb. 2-24*). Wie in *Abb. 2-24* Spur 2 zu sehen ist, wurde sowohl das myc-getaggte Ribophorin I als auch die OST48 Untereinheit überexprimiert, während in scheintransfizierten Zellen (Kontrolle, Spur 1) Ribophorin I-myc nicht und OST48 (endogener Anteil) in deutlich geringerer Menge nachweisbar war.

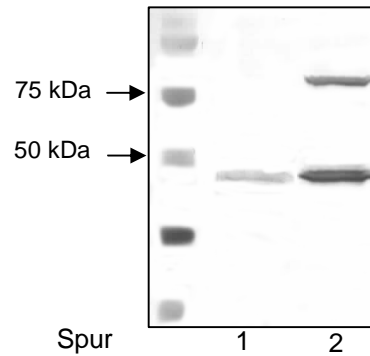


Abb. 2-24: Immunoblotanalyse nach Transfektion von COS 1-Zellen mit pcDNA3 und dem Vektorkonstrukt pCMV-OST48-RI-myc
Solubilisiertes Protein aus COS 1-Zellen wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit einem OST48-spezifischen Antikörper und einem anti-(myc)-Antikörper detektiert A.) mit pcDNA3 transfizierte Zellen, B.) mit pCMV-OST48-RI-myc transfizierte Zellen

Zur Messung der OST-Aktivität nach Koexpression von OST48 und Ribophorin I wurden Aliquots der Zellextrakte mit Dol-PP- $[^{14}\text{C}]$ Chitobiose und Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe inkubiert. Wie die Ergebnisse der Zeitkinetik der Peptidglykosylierung (Abb. 2-25) zeigen, war in dem Zellextrakt nach Transfektion mit dem „Doppelvektor“ eine - verglichen mit Kontrollzellen - etwa 2fach höhere OST-Aktivität nachweisbar.

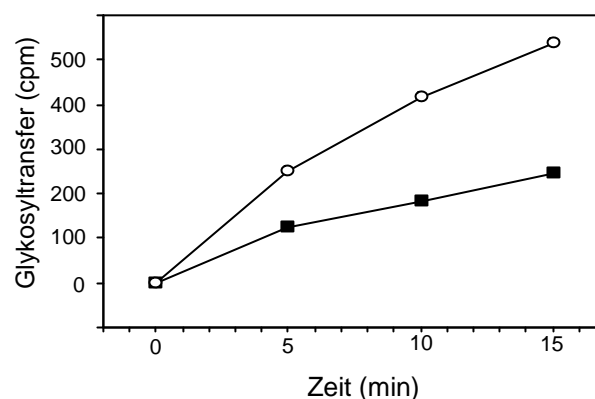


Abb. 2-25: Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe in transfizierten COS 1-Zellen
Aliquots (100 µg Protein/Messung) der Detergenzextrakte wurden mit Dol-PP- $[^{14}\text{C}]$ Chitobiose und dem Standardpeptid inkubiert. Die Reaktionen wurden mit Methanol abgestoppt und die Ansätze wie im Experimentellen Teil beschrieben aufgearbeitet. ■ -mit pcDNA3 transfizierte Zellen; ○ -mit pCMV-OST48-RI-myc transfizierte Zellen.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Beobachtung zu überprüfen, wurden die entsprechenden Experimente mehrfach wiederholt und die aus den verschiedenen Messungen erhaltenen Werte, wie für die Überexpression der einzelnen Untereinheiten beschrieben (s. Kap. 2.3.6.1), auf scheintransfizierte Zellen (OST-Aktivität = 1) normiert.

Verglichen mit der nahezu identischen OST-Aktivität, die nach Überexpression der einzelnen Untereinheiten nachweisbar war, wurde nach Koexpression von OST48 und Ribophorin I ein etwa 1,8facher Anstieg der OST-Aktivität bezogen auf Kontrollzellen gemessen (*Tabelle 2*). Dieser etwa 80 %ige Anstieg der OST-Aktivität ist um so bemerkenswerter, berücksichtigt man, daß in der Regel nur etwa 10-15 % der COS 1-Zellen transfiziert werden. Diese Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß - in Übereinstimmung mit Breuer & Bause (1995) - OST48 und Ribophorin I als katalytische Untereinheiten fungieren und offensichtlich beide Untereinheiten an der Ausbildung katalytischer Aktivität beteiligt sind.

Tab. 2: Glykosylierung des Standardpeptids nach Expression von OST48 und RI-myc in COS 1-Zellen

Die katalytische Aktivität wurde 1,0 (Kontrollzellen) normiert; die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von sechs unabhängigen Ergebnissen dar.

COS1-Zellen transfiziert mit	Relative Erhöhung der katalytischen Akti- vität
pcDNA3	1,0
pCMV-OST48-RI-myc	1,8

Um zu überprüfen, ob die mit OST48/Ribophorin I assoziierte OST-Aktivität durch gleichzeitige Anwesenheit von Ribophorin II bzw. DAD1 beeinflusst wird, wurden COS 1-Zellen mit dem pCMV-OST48-RI-myc „Doppelvektor“ und pCMV-RII-myc bzw. pSVSportDAD1-GFP kotransfiziert. Aliquots der erhaltenen Zellextrakte wurden dann, wie oben beschrieben, durch Immunoblotting analysiert und für Aktivitätsmessungen eingesetzt. Die Ergebnisse der Immunoblotanalyse sind in *Abb. 2-26* zusammengefaßt. Wie zu sehen ist, lassen sich in den Detergenzextrakten sowohl OST48/Ribophorin I und Ribophorin II effektiv überexprimieren (Spur 3). Ähnliches gilt für die Überexpression von OST48/Ribophorin I und DAD1 (Spur 4).

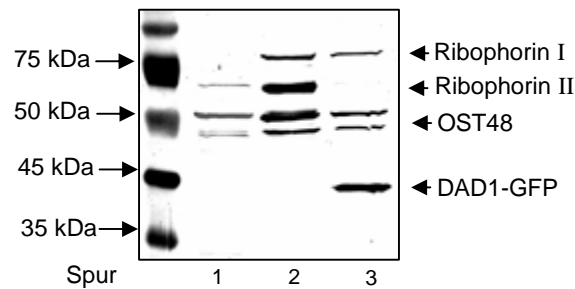


Abb. 2-26: *Immunoblotanalyse mit in COS1-Zellen überexprimierten OST-Untereinheiten*
Aliquots der Extrakte von Zellen, die mit Leervektor (Spur 1), mit DV + pCMV-RII-myc (Spur 2) und DV + pSVSportDAD1-GFP (Spur 3) transfiziert worden waren, wurden in 2x SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose geblottet, mit einem OST48 spezifischen Antikörper, einem myc-Antikörper und dem DAD1 spezifischen Antikörper detektiert.

Messungen der OST-Aktivität mit den verschiedenen Detergenzextrakten zeigten allerdings, daß trotz effektiver Überexpression von OST48/Ribophorin I und Ribophorin II bzw. OST48/Ribophorin I und DAD1 in keinem Falle eine höhere OST-Aktivität meßbar war, wie sie nach Koexpression von OST 48 und Ribophorin I beobachtet wurde. Dies bedeutet, daß, zumindest unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen, DAD1 und Ribophorin II keinen Einfluß auf die durch OST48 und Ribophorin I vermittelte OST-Aktivität zu haben scheinen.

2.3.7 *In vitro* Synthese der OST-Untereinheiten in *E. coli*-Lysaten

Wie oben dargestellt, führte die Koexpression von OST48 und Ribophorin I in COS 1-Zellen zu einer deutlichen und reproduzierbaren Erhöhung der OST-Aktivität, die nicht beobachtet wurde, wenn OST48 oder Ribophorin I alleine überexprimiert wurden. Dies sprach dafür, daß beide Untereinheiten für die Ausbildung katalytischer Aktivität essenziell bzw. direkt an der Katalyse beteiligt zu sein scheinen, wie dies bereits aufgrund früherer Ergebnisse mit dem gereinigten OST-Komplex (Breuer & Bause 1995) sowie aufgrund der Ergebnisse von Doppelmarkierungsexperimenten mit einem Epoxyethyl-glycin-haltigen Peptidinhibitor (Bause et al. 1997) vermutet wurde. Da eine weiterge-

hende Charakterisierung der spezifischen Funktion der beiden Untereinheiten in COS 1-Zellen wegen der relativ hohen endogenen OST-Aktivität wenig erfolgversprechend schien, sollte versucht werden, die beiden Untereinheiten OST48 und Ribophorin I in *E. coli*-Lysaten zu synthetisieren und diese dann zu einem katalytisch aktiven Komplex unter zellfreien Bedingungen zu rekonstituieren. Zur Synthese der beiden Untereinheiten sollte ein gekoppeltes *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem aus *E. coli* (RTS, Rapid Translation System; Fa. Roche) eingesetzt werden, mit dem es möglich ist durch direkte Programmierung mit den entsprechenden cDNAs bis zu 20 µg des jeweiligen Proteins zu synthetisieren. Wie Vorversuche zeigten, führte die Programmierung des RTS-Systems mit Vektorkonstrukten, die die OST48- bzw. Ribophorin I-spezifische Wildtyp-cDNA in dem speziell für dieses System entwickelten pIVEX-2.3MCS-Vektor (pIV-OST48 bzw. pIV-RI) enthielten, im Falle von OST48 zwar zu einem ~48 kDa großen Translationsprodukt, das jedoch nur in äußerst geringen Mengen synthetisiert wurde. Im Falle von Ribophorin I war kein Produkt der erwarteten Molmasse von 68 kDa nachweisbar.

2.3.7.1 Optimierung der Basensequenz im 5'-kodierenden Bereich von OST48 und Ribophorin I

Es ist bekannt, daß die Synthese von Polypeptiden im *E.coli*-System durch die Basensequenz im 5'-kodierenden Bereich der zur Programmierung eingesetzten cDNAs stark beeinflusst wird, was möglicherweise ein Grund für die oben beschriebene schlechte Expression von OST48 und Ribophorin I sein könnte. Um die Syntheseausbeute beider Untereinheiten im RTS100 zu optimieren, wurde deshalb ein von der Firma Roche entwickeltes Verfahren angewendet, daß darauf beruht, durch gezielten Austausch von Basen im 5'-kodierenden Bereich die Translatierbarkeit der entsprechenden cDNAs (im vorliegenden Fall für OST48 und Ribophorin I) zu verbessern. Die Einführung dieser Basenmutationen in die OST48 bzw. Ribophorin I-spezifische cDNA erfolgte mittels PCR (1. PCR) unter Verwendung von Primern, deren Sequenzen aufgrund experimenteller und statistischer Daten durch die Firma Roche (ProteoExpert) ermittelt wurden. Die jeweiligen Basenaustausche wurden dabei so gewählt, daß sie nicht zu Aminosäureaustauschen führten. Die nach der 1. PCR erhaltenen cDNA-Amplifikate (mit unterschiedlichen Basensequenzen im 5'-kodierenden Bereich) wurden dann als Templates

in einer 2. PCR unter Verwendung entsprechend konstruierter Primer, die von der Firma Roche geliefert wurden (linear template generation set), eingesetzt, um regulatorische Elemente (T7-Promotor, ribosomale Bindungsdomäne, T7-Terminator) sowie eine His-tag-Sequenz an das 3'- bzw. 5'-Ende anzuheften. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 2-27 dargestellt.

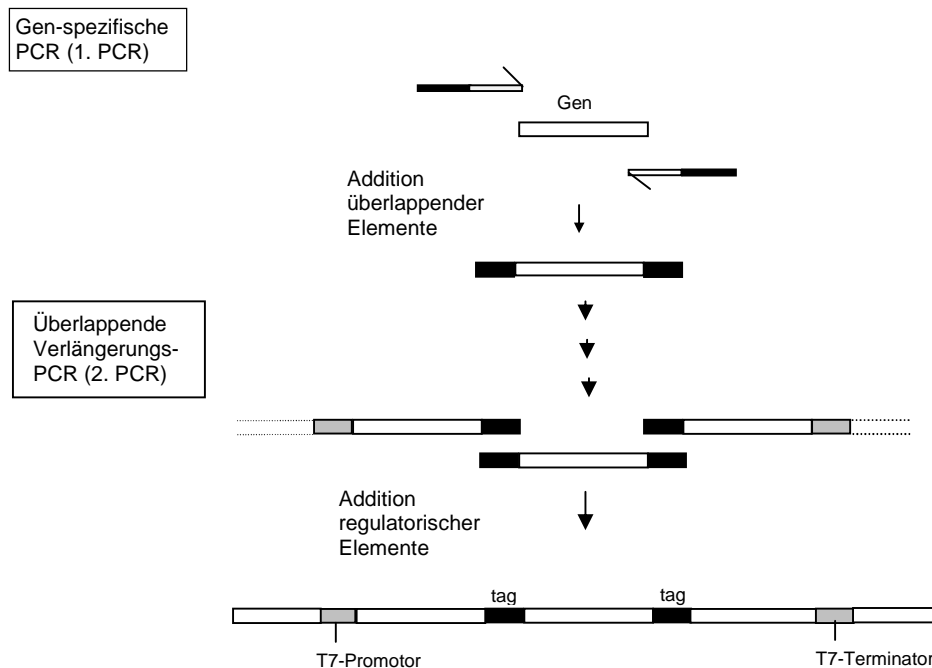


Abb. 2-27: Prinzip der Herstellung linearer PCR-Produkte für die *in vitro* Proteinexpression im RTS100

Zur Herstellung linearer DNA für die Expression von Proteinen im RTS100-System werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. In der 1. PCR werden überlappende Elemente (schwarze Balken) an die gewünschte Gensequenz angefügt. Über die 2. PCR-Reaktion werden regulatorische Elemente wie T7-Promotor, ribosomale Bindungsdomäne, T7-Terminator (graue Balken) sowie eine His-tag-Sequenz angeheftet. Das in der 2. PCR erhaltene Fragment kann direkt zur Programmierung des RTS100 benutzt werden.

Die Sequenzen der sense Primer, die in der 1. PCR zur Einführung der Basenmutationen eingesetzt wurden, wurden so gewählt, daß der Basenbereich, der für die N-terminale Signalsequenz kodiert, deletiert wurde. Die Deletion des für die Signalsequenz kodierenden cDNA-Bereichs in beiden Untereinheiten schien sinnvoll, da diese im *E. coli*-Lysat unter den *in vitro* Bedingungen nicht abgespalten wird und nicht auszuschlie-

ßen war, daß hierdurch eine Interaktion der beiden Untereinheiten gestört werden könnte. Insgesamt wurden in der 1. PCR 10 verschiedene cDNA-Varianten mit unterschiedlichen Basensequenzen im N-terminalen Bereich sowie cDNA-Amplifikate mit der jeweiligen Wildtyp-Sequenz (Kontrolle) hergestellt. *Abb. 2-28* zeigt die Ribophorin I-spezifischen Amplifikationsprodukte, die nach der 1. PCR erhalten wurden. Wie zu sehen ist, wurden in allen Fällen Produkte mit der erwarteten Größe von (~1890 bp) gebildet.

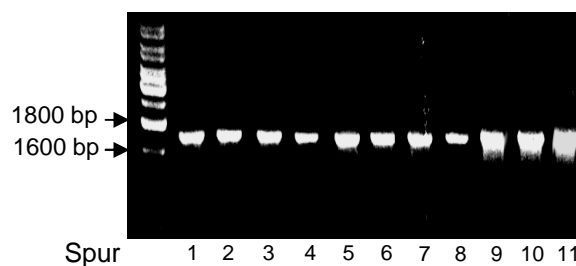


Abb. 2-28: *Typische Produkte der 1. PCR-Reaktion nach Einführung verschiedener Mutationen in die Ribophorin I-spezifischen-cDNA*
Die PCR-Reaktion wurde wie im Experimentellen Teil beschrieben ausgeführt, die PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Spuren 1-10: cDNA-Varianten 1-10; Spur 11: Wildtyp-cDNA

Die Amplifikationsprodukte der 1. PCR-Runde wurden aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und anschließend als Templates in einer 2. PCR-Reaktion eingesetzt (*Abb. 2-29*). Wie zu erwarten führte die Einführung der His-tag-Sequenz und der regulatorischen Elemente zu cDNA-Amplifikaten, die etwa 330 bp größer waren, als die als Template eingesetzten cDNA-Varianten, die nach der 1. PCR erhalten wurden. Mit dem gleichen experimentellen Ansatz, wie für Ribophorin I, wurden 10 OST48-spezifische cDNA-Varianten mit entsprechenden Mutationen im 5'-Bereich dieser Untereinheit hergestellt (nicht gezeigt).

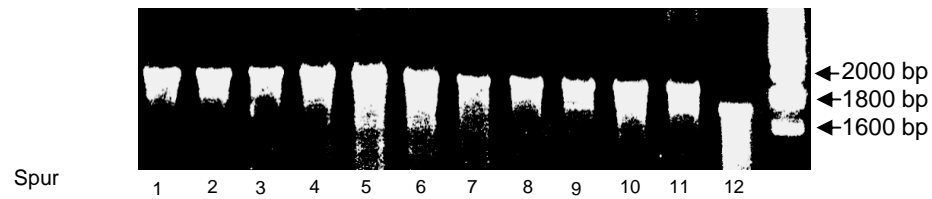


Abb. 2-29: *Analyse der PCR-Produkte nach Einführung regulatorischer Elemente (2. PCR) an die Ribophorin I-spezifischen Produkte der 1. PCR*
Die PCR-Reaktionen wurden wie im Experimentellen Teil beschreiben ausgeführt, die PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Spuren 1-10: cDNA-Varianten 1-10; Spur 11: Wildtyp-cDNA; Spur 12: Produkt der 1. PCR (Kontrolle).

Die verschiedenen nach der 2. PCR erhaltenen linearen cDNA-Fragmente wurden anschließend direkt zur Programmierung des RTS-Systems (siehe Experimenteller Teil) eingesetzt. Gleiche Aliquots der RTS-Ansätze wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblotting mit einem anti-(His₆)-Antikörper analysiert. Wie die Ergebnisse in *Abb. 2-30 A* zeigen, lieferte die Programmierung des RTS-Systems mit den OST48-spezifischen cDNA-Mutanten 2, 3, 4, 6, 7, 8 (Spuren 2, 3, 4, 6, 7, 8) kein bzw. nur geringe Mengen an OST48 Translationsprodukt. Deutlich größere Proteinmengen wurden hingegen nach Programmierung des RTS-Systems mit den cDNA-Mutanten 1, 5, 9 und 10 (Spuren 1, 5, 9, 10) erhalten, wobei die höchste Translationsrate mit der cDNA-Mutante 1 erzielt wurde, die zudem deutlich höher war als in der Kontrolle (OST48-spezifische Wildtyp-cDNA; Spur 11).

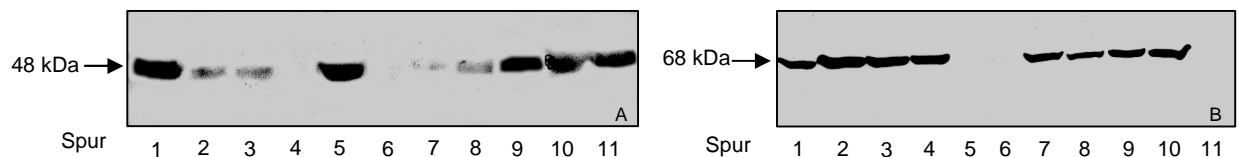


Abb. 2-30: *Immunoblotanalyse mit den im RTS-System synthetisierten OST-Untereinheiten Ribophorin I und OST48 nach (Spuren 1-10) und vor Basenoptimierung (Spur WT)*
3 µl Aliquots der einzelnen RTS-Ansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und mit einem anti-(His)-Antikörper inkubiert. Blot A: Ribophorin I; Blot B: OST48.

Im Falle von Ribophorin I (*Abb. 2-30 B*) war die Translationsrate mit den RI-spezifischen cDNA-Varianten 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 und 10 (Spuren 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10) relativ hoch (am höchsten in Spur 2), während nach Programmierung mit den cDNA-Mutanten 5 und 6 (Spuren 5, 6) und der Wildtyp-cDNA (Spur 11) keine Translationsprodukte erkennbar waren.

Die oben dargestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die relativ geringe Syntheserate von OST48 und die nicht nachweisbare Bildung von Ribophorin I nach Programmierung des RTS-Systems mit den jeweiligen Wildtyp-cDNAs tatsächlich auf eine für die Expression in *E. coli* nicht optimale Basensequenz im 5'-kodierenden Bereich der beiden Untereinheiten zurückzuführen waren. Aufgrund der in *Abb. 2-30* dargestellten Ergebnisse wurden für die Synthese der beiden Untereinheiten im RTS-System im Falle von OST48 die cDNA-Variante 1 und im Falle von Ribophorin I die cDNA-Variante 2, die vorher in den pcRII-Topo-Vektor einkloniert wurden (pcTo-OST48; pcTo-RI; s. Anhang), als Templates eingesetzt.

2.3.7.2 Charakterisierung der im RTS100 synthetisierten OST48- und Ribophorin I-Untereinheiten

Zur Synthese von OST48 und Ribophorin I wurden die RTS-Lysate zum einem mit pcTo-OST48 und pcTo-RI alleine und zum anderen mit beiden Vektorkonstrukten zusammen programmiert. Parallel dazu wurde eine Serie entsprechender RTS-Ansätze bei gleichzeitiger Anwesenheit von 0,3 % Phosphatidylcholin bzw. 1 % N-Octyl- β -D-glucosid durchgeführt. Die RTS-Ansätze wurden 6 h bei 30°C inkubiert und Aliquots anschließend durch Immunoblotanalyse und durch Messung der OST-Aktivität überprüft. Ein typischer Immunoblot von RTS-Reaktionen, die in Ab- (Spur 1-4) bzw. Anwesenheit (Spur 4-8) von 0,3 % Phosphatidylcholin programmiert worden waren, ist in *Abb. 2-31* dargestellt. Wie zu sehen ist, erkennt der anti-(His₆)-Antikörper nach Programmierung mit der OST48-spezifischen cDNA (Spur 2 und 6) ein ca. 48 kDa großes Protein, während nach Programmierung mit pcTo-RI ein ca. 70 kDa Protein gebildet wurde (Spur 3 und 7). Weder das 48 kDa Protein (OST48) noch das 70 kDa Protein (Ribophorin I) waren in Kontrollzellen (Spur 1 und 5) nachweisbar. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt zudem, daß nach Programmierung des RTS-Lysates mit der cDNA von OST48 **und** Ribophorin I beide Untereinheiten im gleichen Ansatz synthetisierbar

sind (Spur 4+8), wobei die Anwesenheit von Phosphatidylcholin im RTS-Lysat offensichtlich keinen Einfluß auf die Translationsrate hat. Im Gegensatz hierzu waren in Anwesenheit von 1 % Octylglucosid im RTS-Lysat keine Translationsprodukte nachweisbar (nicht gezeigt).

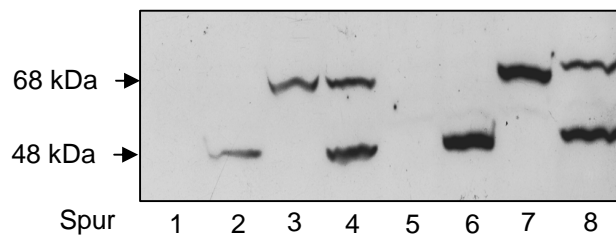


Abb. 2-31: *Translation von OST48 und Ribophorin I im RTS-System*
RTS-Ansätze wurden mit pcRII-Topo (Spur 1, 5), pcTo-OST48 (Spur 2, 6), pcTo-RI (Spur 3, 7), und pcTo-OST48 + pcTo-RI (Spur 4, 8) in Ab- (Spuren 1-4) bzw. Anwesenheit (Spuren 4-8) von 0,3 % Phosphatidylcholin programmiert. Aliquots der Ansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit einem gegen den His-tag gerichteten Antikörper inkubiert.

Zur Messung der OST-Aktivität wurden Aliquots (40 µl) der verschiedenen RTS-Ansätze mit 2400 cpm Dol-PP- ^{14}C Chitobiose und 1 mM Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 3 h wurden die Reaktionen durch Zugabe von 750 µl Chloroform, 500 µl Methanol und 210 µl Wasser (3:2:1 Verteilung) abgestoppt und nach Zentrifugation die wäßrige Oberphase direkt im Counter ausgezählt. Es zeigte sich, daß in allen Proben einschließlich der Kontrolle (!) etwa 55-65 % der Radioaktivität in der wäßrigen Oberphase nachweisbar war. Dies läßt den Schluß zu, daß die zuvor Dol-PP-gebundene ^{14}C -Chitobiose durch im RTS-Lysat vorhandene Aktivitäten in eine wasserlösliche Form überführt wird. Eine Erklärung hierfür wäre, daß im RTS-Lysat vorhandene Pyrophosphatasen die Dol-PP- ^{14}C Chitobiose unspezifisch hydrolysieren. Durch Zugabe von Pyrophosphataseinhibitoren (z. B. Methylendiphosphonsäure, Imidodiphosphat) zum Standardassay konnte der relativ hohe Anteil an Radioaktivität in der wäßrigen Oberphase jedoch nicht reduziert werden. Wahrscheinlicher ist deshalb, daß *E. coli* spezifische Transferasen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit zelleigenen Lipidvorstufen Dol-PP- ^{14}C Chitobiose als Substrat akzeptieren und umsetzen. In der

Tat wurde erst kürzlich gefunden, daß offensichtlich auch Prokaryonten N-glykosidische Glykoproteine synthetisieren können. In diesem Falle scheint PglB, ein zum STT3 homologes Protein, an der Ausbildung N-glykosidischer Bindungen im prokaryontischen System beteiligt zu sein (Wacker et al. 2002). Der unerwartet hohe Anteil an wasserlöslicher Radioaktivität, der nach Inkubation der RTS-Lysate mit Dol-PP-Chitobiose auch bereits in den Kontrollansätzen zu beobachten war, verhinderte letztlich aussagekräftige Messungen bzw. Aussagen zur Aktivität der synthetisierten OST48- bzw. Ribophorin I-Untereinheit, zumindest wenn das Chitobiosylderivat als Glykosyldonor eingesetzt wurde.

2.3.7.3 Aktivitätsmessungen mit Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃

Da die Aktivitätsmessungen mit den im RTS-System synthetisierten OST-Untereinheiten unter Verwendung von Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose als Glykosyldonor keine verlässlichen Ergebnisse lieferten, wurde für die Aktivitätsmessungen das „natürliche“ OST-Substrat Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃ eingesetzt. Aufgrund der komplexen Zuckerstruktur im Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃-Glykosyldonor wurde erwartet, daß dieses Substrat von endogenen Aktivitäten im *E. coli*-Lysat deutlich schlechter gebunden bzw. umgesetzt wird. Orientierende Messungen mit RTS-Lysaten, die nicht mit DNA programmiert wurden (Kontrolle), zeigten in der Tat, daß selbst nach 5 stündiger Inkubation nur ein geringer Anteil der Dol-PP-gebundenen Radioaktivität in der wäßrigen Oberphase nachweisbar war, während der größte Teil in der organischen Unterphase verblieb. Dies zeigte somit, daß Messungen der OST-Aktivität direkt im RTS-Lysat mit diesem Substrat möglich sein sollten. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen mit RTS-Lysaten, die mit der OST48- bzw. Ribophorin I-spezifischen cDNA programmiert worden waren, unter Verwendung von Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃ und Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe sind in *Tabelle 3* zusammengefaßt. Angegeben sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, wobei die Werte jeweils auf die Aktivität in der Kontrolle (= 100 %) normiert wurden. Wie zu sehen ist, wurden nach Synthese von OST48 bzw. Ribophorin I keine signifikanten Aktivitätsunterschiede gegenüber der Kontrolle erhalten. Im Gegensatz hierzu wurde in den RTS-Lysaten, die OST48 **und** Ribophorin I enthielten, eine 20-25 %ige Erhöhung der Radioaktivität in der wäßrigen Phase beobachtet. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß OST48 und Ribophorin I alleine keine katalytische Aktivität aufwei-

sen, und daß die Ausbildung katalytischer Aktivität in der Tat die Anwesenheit beider Untereinheiten erfordert, was letztlich mit den Ergebnissen der Expressionsversuche in COS 1-Zellen übereinstimmt (Kap. 2.3.5).

Tab. 3: *Glykosylierung des Standardpeptids nach Expression von OST48 und RI-myc im RTS100 System*
Die katalytische Aktivität wurde 1,0 (Kontrollzellen) normiert, die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von 3 unabhängigen Ergebnissen dar.

RTS100 programmiert mit	katalytische Aktivität
Kontrolle	1,00
OST48	1,05
Ribophorin I	0,96
OST48/Ribophorin I	1,23

Aufgrund des insgesamt nur mäßigen Aktivitätsanstiegs nach Kotranslation von OST48 und Ribophorin I im *E. coli*-Lysat, wurde auf weitergehende Versuche (Einbau der im RTS-Lysat synthetisierten Untereinheiten in Liposomen und Rekonstitution eines katalytisch aktiven OST-Teilkomplexes) verzichtet.

2.3.8 Klonierung und Charakterisierung von STT3 aus menschlicher Leber

Arbeiten von Yoshida et al. (1995) haben gezeigt, daß ein 78 kDa Protein (STT3), das in Hefe identifiziert wurde, eine essentielle Untereinheit des OST-Komplexes darstellt und vermutlich direkt an der Katalyse beteiligt ist. Um die STT3-cDNA für weitere Versuche zur Verfügung zu haben, wurde diese mittels entsprechender Primer und unter Verwendung einer cDNA-Bank aus humaner Leber als Template durch PCR amplifiziert. Das amplifizierte 2500 bp PCR-Fragment wurde in den Vektor pcDNA3 kloniert und sequenziert. Die in Abb. 2-30 dargestellte STT3-cDNA zeigt eine 60 %ige Homologie zu der entsprechenden Sequenz aus Hefe und ist, wie erwartet 100 % homolog zur Sequenz aus Mensch. Die cDNA-Sequenz enthält ein 2115 bp langes offenes Leseraster (ORF) zwischen bp 46 und bp 2161. 3'-wärts schließt sich ein 289 bp langer nichttranslatierter Bereich an, der zwischen bp 2390 und bp 2395 ein Polyadenylierungssignal enthält und in einer 40 bp langen Poly A-Sequenz endet. Die aus dem ORF

abgeleitete Aminosäuresequenz enthält drei potentielle N-Glykosylierungsstellen vom Typ Asn-Xaa-Thr/Ser (Asn-381, Asn-537 und Asn-548).

1					AGC	CGG	CCA	GCT	GAT	CGT	CGT	GTG	TTG	CCA	CCC	ATT	CAT	GTC	AAG	
	Met	Thr	Lys	Phe	Gly	Phe	Leu	Arg	Leu	Ser	Tyr	Glu	Lys	Gln	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	19
46	ATG	ACT	AAG	TTT	GGA	TTT	TTG	CGA	TTG	TCC	TAT	GAG	AAG	CAG	GAC	ACA	CTT	TTG	AAG	
	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Met	Ala	Ala	Val	Leu	Ser	Phe	Ser	Thr	Arg	Leu	Phe	Ala	Val	38
103	CTT	CTC	ATT	CTG	TCA	ATG	GCT	GCT	GTA	TTA	TCC	TTC	TCC	ACT	CGT	CTG	TTT	GCT	GTC	
	Leu	Arg	Phe	Glu	Ser	Val	Ile	His	Glu	Phe	Asp	Pro	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Arg	Thr	Thr	57
160	CTG	AGA	TTT	GAA	AGT	GTT	ATC	CAT	GAG	TTT	GAT	CCG	TAC	TTT	GAT	GAC	CGA	GCC	TGG	
	Arg	Phe	Leu	Ala	Glu	Glu	Gly	Phe	Tyr	Lys	Phe	His	Asn	Trp	Phe	Asp	Asp	Arg	Ala	76
217	AGG	TTC	CTG	GCT	GAG	GAG	GGG	TTT	TAT	AAA	TTC	CAT	AAC	TGG	TTT	GAT	GAC	CGA	GCC	
	Trp	Tyr	Pro	Leu	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Leu	Met	Ile	Thr	95
274	TGG	TAC	CCT	TTG	GGA	CGA	ATC	ATT	GGA	GGA	ACA	ATT	TAC	CCA	GGT	TTA	ATG	ATC	ACC	
	Ser	Ala	Ala	Ile	Tyr	His	Val	Leu	His	Phe	Phe	His	Ile	Thr	Ile	Asp	Ile	Arg	Asp	114
331	TCT	GCT	GCA	ATC	TAC	CAT	GTA	CTC	CAT	TTT	TTC	CAC	ATC	ACC	ATC	GAC	ATT	CGG	AAT	
	Val	Cys	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	Phe	Ser	Ser	Phe	Thr	Thr	Ile	Val	Thr	Tyr	His	133
388	GTC	TGT	GTG	TTC	CTG	GCC	CCT	CTC	TTC	TCC	TCC	TTC	ACC	ACC	ATC	GTC	ACG	TAC	CAC	
	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Ile	Ala	152
445	CTT	ACC	AAA	GAG	CTC	AAG	GAT	GCA	GGG	GCT	GGG	CTT	CTT	GCT	GCT	GCC	ATG	ATT	GCT	
	Val	Val	Phe	Gly	Tyr	Ile	Ser	Arg	Ser	Val	Ala	Gly	Ser	Tyr	Asp	Asn	Glu	Gly	Ile	171
502	GTA	GTT	CCT	GGA	TAT	ATC	TCC	CGA	TCT	GTG	GCT	GGC	TCC	TAT	GAT	AAT	GAA	GGG	ATT	
	Ala	Ile	Phe	Cys	Met	Leu	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Met	Trp	Ile	Lys	Ala	Val	Lys	Thr	Gly	190
559	GCC	ATC	TTT	TGC	ATG	CTA	CTC	ACC	TAC	TAC	ATG	TGG	ATC	AAG	GCA	GTA	AAG	ACT	GGT	
	Ser	Ile	Cys	Trp	Ala	Ala	Lys	Cys	Ala	Leu	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Met	Val	Ser	Ser	Trp	209
616	TCC	ATC	TGT	TGG	GCA	GCT	AAG	TGT	GCC	CTT	GCT	TAT	TTC	TAC	ATG	GTC	TCG	TCA	TGG	
	Gly	Gly	Tyr	Val	Phe	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Pro	Leu	His	Val	Leu	Val	Leu	Met	Leu	228
673	GGA	GGT	TAT	GTG	TTC	CTG	ATC	AAC	TTA	ATT	CCT	CTC	CAC	GTC	CTC	GTG	CTG	ATG	CTC	
	Thr	Gly	Arg	Phe	Ser	His	Arg	Ile	Tyr	Val	Ala	Tyr	Cys	Thr	Val	Tyr	Cys	Leu	Gly	247
730	ACA	GGC	CGT	TTC	TCT	CAC	CGG	ATC	TAT	GTG	GCC	TAC	TGT	ACT	GTT	TAC	TGC	CTG	GGC	
	Thr	Ile	Leu	Ser	Met	Gln	Ile	Ser	Phr	Val	Gly	Phe	Gln	Pro	Val	Leu	Ser	Ser	Glu	266
787	ACT	ATA	CTT	TCT	ATG	CAG	ATC	TCC	TTT	GTG	GGT	TTC	CAG	CCT	GTC	CTT	TCA	TCA	GAG	
	His	Met	Ala	Ala	Phe	Gly	Val	Phe	Gly	Leu	Cys	Gln	Ile	His	Ala	Phe	Val	Asp	Tyr	285
844	CAC	ATG	GCA	GCC	TTT	GGG	GTC	TTT	GGT	CTC	TGC	CAG	ATC	CAT	GCC	TTT	GTG	GAT	TAC	
	Leu	Arg	Ser	Lys	Leu	Asn	Pro	Gln	Gln	Phe	Glu	Val	Leu	Phe	Arg	Ser	Val	Ile	Ser	304
901	CTG	CGC	AGC	AAG	TTG	AAT	CCA	CAA	CAA	TTT	GAA	GTT	CTT	TTC	CGG	AGC	GTC	ATC	TCT	
	Leu	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Lys	Ile	323
958	CTG	GTA	GGC	TTT	GTC	CTT	CTC	ACC	GTG	GGA	GCT	CTC	CTC	ATG	CTG	ACA	GGA	AAA	ATA	
	Ser	Pro	Trp	Thr	Gly	Arg	Phe	Tyr	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Asn	Asn	342
1015	TCT	CCC	TGG	ACG	GGG	CGT	TTC	TAC	TCG	CTG	CTG	GAT	CCC	TCT	TAT	GCT	AAG	AAC	AAC	
	Ile	Pro	Ile	Ile	Ala	Ser	Val	Ser	Glu	His	Gln	Pro	Thr	Thr	Trp	Ser	Ser	Tyr	Tyr	361
1072	ATC	CCC	ATC	ATT	GCT	TCT	GTG	TCT	GAG	CAT	CAG	CCC	ACA	ACC	TGG	TCC	TCA	TAC	TAT	
	Phe	Asp	Leu	Gln	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Ser	380
1129	TTT	GAC	CTG	CAG	CTC	CTC	GTC	TTC	ATG	TTT	CCA	GTT	GGC	CTC	TAT	TAC	TGC	TTT	AGC	
	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	Arg	Ile	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Gly	Val	Thr	Ser	Met	Tyr	Phe	399
1186	AAC	CTG	TCT	GAT	GCC	CGG	ATT	TTT	ATC	ATC	ATG	TAT	GGT	GTG	ACC	AGC	ATG	TAC	TTT	
	Ser	Ala	Val	Met	Val	Arg	Leu	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Ser	418
1243	TCA	GCT	GTA	ATG	GTG	CGT	CTA	ATG	CTA	GTG	TTG	GCA	CCT	GTT	ATG	TGC	ATT	CTC	TCT	
	Gly	Ile	Gly	Val	Ser	Gln	Val	Leu	Ser	Thr	Tyr	Met	Lys	Asn	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	437
1300	GGC	ATT	GGA	GTC	TCC	CAG	GTG	CTG	TCC	ACA	TAC	ATG	AAG	AAT	CTG	GAC	ATA	AGT	CGT	
	Pro	Asp	Lys	Lys	Ser	Lys	Lys	Gln	Gln	Asp	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ile	Lys	Asn	Glu	Val	456
1357	CCA	GAC	AAG	AAG	AGC	AAG	AAG	CAA	CAG	GAT	TCC	ACC	TAC	CCT	ATT	AAG	AAT	GAA	GTG	
	Ala	Ser	Gly	Met	Ile	Leu	Val	Met	Ala	Phe	Phe	Leu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Phe	His	Ser	475
1414	GCA	AGT	GGG	ATG	ATA	CTG	GTC	ATG	GCT	TTC	TTT	CTC	ATC	ACC	TAC	ACC	TTT	CAT	TCA	
	Thr	Trp	Val	Thr	Ser	Glu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ser	Ile	Val	Leu	Ser	Ala	Arg	Gly	494

```

1471 ACC TGG GTG ACC AGT GAG GCC TAC TCT TCT CCG TCC ATT GTA CTA TCT GCC CGT GGT
      Gly Asp Gly Ser Arg Ile Ile Phe Asp Asp Phe Arg Glu Ala Tyr Tyr Trp Leu Arg 513
1528 GGG GAT GGC AGT AGG ATC ATA TTT GAT GAC TTC CGA GAA GCA TAT TAT TGG CTT CGT
      His Asn Thr Pro Glu Asp Ala Lys Val Met Ser Trp Trp Asp Tyr Gly Tyr Gln Ile 532
1585 CAT AAT ACT CCA GAG GAT GCG AAG GTC ATG TCC TGG TGG GAT TAT GGC TAT CAG ATT
      Thr Ala Met Ala Asn Arg Thr Ile Leu Val Asp Asn Asn Thr Trp Asn Asn Thr His 551
1642 ACA GCT ATG GCA AAC CGA ACA ATT TTA GTG GAC AAT AAC ACA TGG AAT AAT ACC CAT
      Ile Ser Arg Val Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Glu Lys Ala Tyr Glu Ile Met 570
1699 ATT TCT CGA GTA GGG CAG GCA ATG GCG TCC ACA GAG GAA AAA GCC TAT GAG ATC ATG
      Arg Glu Leu Asp Val Ser Tyr Val Leu Val Ile Phe Gly Gly Leu Thr Gly Tyr Ser 589
1756 AGG GAG CTT GAT GTC AGC TAT GTG CTG GTC ATT TTT GGA GGC CTC ACT GGG TAT TCC
      Ser Asp Asp Ile Asn Lys Phe Leu Trp Met Val Arg Ile Gly Gly Ser Thr Asp Thr 607
1813 TCT GAT GAT ATC AAC AAG TTT CTT TGG ATG GTC CGG ATT GGA GGG AGC ACA GAT ACA
      Gly Lys His Ile Lys Glu Asn Asp Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Phe Arg Val Asp 626
1870 GGC AAA CAT ATC AAG GAG AAT GAC TAT TAT ACT CCA ACT GGG GAG TTC CGT GTG GAC
      Arg Glu Gly Ser Pro Val Leu Leu Asn Cys Leu Met Tyr Lys Met Cys Tyr Tyr Arg 645
1927 CGT GAA GGT TCT CCA GTG CTG CTC AAC TGC CTC ATG TAC AAG ATG TCT TAC TAT CGC
      Phe Gly Gln Val Tyr Thr Glu Ala Lys Arg Pro Pro Gly Phe Asp Arg Val Arg Asn 664
1984 TTT GGA CAG GTT TAC ACA GAA GCC AAG CGT CCT CCA GGC TTT GAC CGT GTC CGA AAT
      Ala Asp Ile Gly Asn Lys Asp Phe Glu Leu Asp Val Leu Glu Glu Ala Tyr Thr Thr 683
2041 GCT GAG ATT GGG AAT AAA GAC TTT GAG CTT GAT GTC CTG GAG GAA GCA TAT ACC ACA
      Glu His Trp Leu Val Arg Ile Tyr Lys Val Lys Asp Leu Asp Asn Arg Gly Leu Ser 702
2098 GAA CAT TGG CTG GTC AGG ATA TAC AAG GTA AAG GAC CTG GAT AAT CGA GGC TTG TCA
      Arg Thr *
2155 AGG ACA TAA ATG TCA CGT CCA GCT CTG ATA TCG TTC GCA CTG AGC ACA TCA CAT TTA
2212 GGA CGT TGA AGA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAT ATG CAG TTT GTA AGA ACA AAA
2169 CTG GAT GGC ATC AGA ATT GTC TGG AAG TTT TGT CTT GGG CAG TAT GGG CTG GGC CAA
2326 ATG AAA TGA TTT TTA TAA TTC TAA ACA GGT TAC CAA ATG AAA TGT CAT GGC TTT ACT
2383 TTG GTC AAT TAA AGG GGG GAA TTT TTT TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
2440 AAA AAA AAA AA

```

Abb. 2-32: Basen- und Aminosäuresequenz von STT3
Basen sind links, Aminosäuren rechts angegeben

Die Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz nach Kyte und Doolittle (1982), die in Abb. 2-33 dargestellt ist, zeigt, daß die STT3-Polypeptidkette, insbesondere in der N-terminalen Hälfte, mehrere (10-12) stark hydrophobe Sequenzbereiche enthält, die vermutlich als Transmembrandomänen fungieren. Im Gegensatz hierzu ist der C-terminale Sequenzbereich, der nach Yoshida et al. (1995) zum Lumen des Endoplasmatischen Retikulums hin orientiert sein soll, wesentlich polarer.

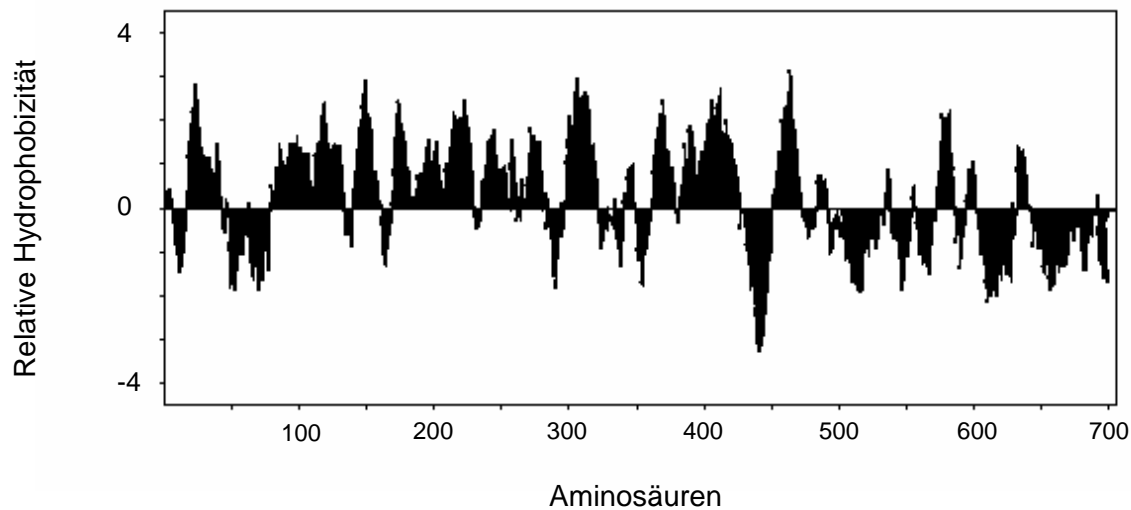


Abb. 2-33: *Hydrophobizitätsanalyse von STT3 nach Kyte & Doolittle (1982)*
Es wurde das gesamte offene Leseraster von STT3 berechnet. Die Fenstergröße betrug 7 Aminosäuren

Zur *in vitro* Expression des STT3-Proteins wurde das T7-TNT-Quick-Coupled-System (Firma Promega) benutzt, welches es erlaubt, Transkription und Translation in einem Schritt durchzuführen. Hierzu wurden nach Angaben des Herstellers ein TNT-Quick-Master-Mix, [³⁵S]Methionin und die STT3-cDNA im pcDNA3-Vektor (pcSTT3) sowie pcDNA3-Leervektor (Kontrolle) zusammengegeben und die Ansätze 1,5 h bei 30°C inkubiert. Die SDS-PAGE-Analyse der Translationsprodukte (*Abb. 2-34*) zeigte, daß nach Programmierung mit dem pcSTT3-Vektor ein Protein spezifisch synthetisiert wurde, das in Kontrollansätzen nicht nachweisbar war. Dieses ³⁵S-markierte Protein läuft jedoch nicht wie erwartet bei 78 kDa (entsprechend der aus dem ORF errechneten Molmasse), sondern als diffuse Bande zwischen 50 und 60 kDa.

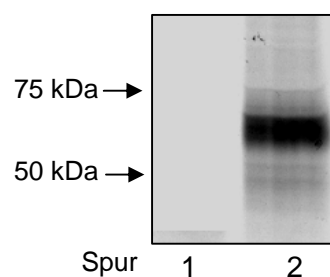


Abb. 2-34: *Gekoppelte in vitro Translation/Transkription von STT3*
Spur 1: Kontrollansatz (Leervektor), Spur 2: Translationsansatz mit dem pcSTT3 Vektor

Dieses „anormale“ Laufverhalten von STT3 in SDS-Gelen wurde schon früher beobachtet (Karaoglu 1997) und ist vermutlich auf den überdurchschnittlich hohen Anteil hydrophober Aminosäuren in der STT3-Polypeptidkette zurückzuführen.

Arbeiten von Zufferey et al. (1995) und Yan und Lennarz (2002) deuten darauf hin, daß die STT3 Untereinheit des OST-Komplexes aus Hefe eine wichtige Rolle bei der Katalyse spielt. Um zu überprüfen, ob die Expression von STT3 in COS 1-Zellen, wie im Falle der Koexpression von OST48 und Ribophorin I beobachtet, zu einer Erhöhung der OST-Aktivität führt, wurden Zellen mit dem pcSTT3-Vektor sowie dem Leervektor (Kontrolle) nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach Lyse der Zellen mit Triton X-100-haltigem Puffer wurden Aliquots der Detergenzextrakte mit Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ und Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe unter Standardbedingungen inkubiert und die OST-Aktivität, wie im Experimentellen Teil beschrieben, bestimmt. Wie die Ergebnisse der Zeitkinetik in Abb. 2-35 zeigen, wurde nach Transfektion der COS 1-Zellen mit der STT3-cDNA keine aussagekräftige Aktivitätssteigerung im Vergleich zu pcDNA3 transfizierten Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse waren in mehreren unabhängigen Experimenten reproduzierbar.

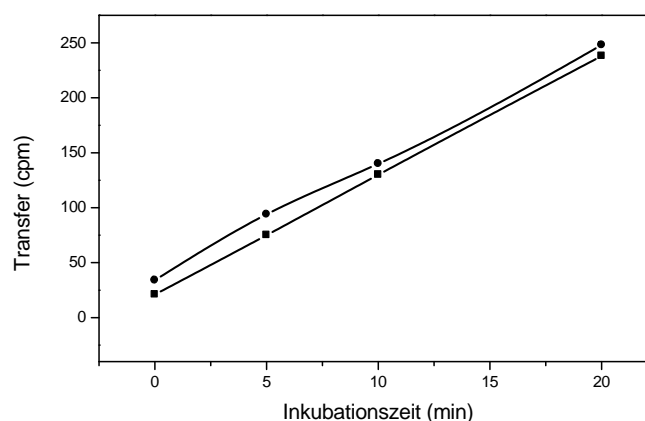


Abb. 2-35: OST-Aktivitätsmessung mit COS 1-Zellen, die mit pcSTT3 transfiziert wurden. Aliquots (100 µg Protein/Messung) der Detergenzextrakte wurden mit Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose und dem Standardpeptid inkubiert. Die Reaktionen wurden mit Methanol abgestoppt und wie im Experimentellen Teil beschrieben aufgearbeitet. ■ -mit pcDNA3 transfizierte Zellen; ● -mit pcSTT3 transfizierte Zellen.

3 Diskussion

Die Oligosaccharyltransferase überträgt Dol-PP-aktivierte Oligosaccharide auf spezifische Asparaginreste wachsender Polypeptidketten, sofern die Akzeptoraminosäure Teil einer Signalsequenz vom Typ Asn-Xaa-Thr/Ser ist. Die katalytische Aktivität des OST-Komplexes aus Schwein ist assoziiert mit einem hetero-oligomeren Proteinkomplex, der neben OST48, Ribophorin I und Ribophorin II vermutlich ein weiteres ~40 kDa Protein sowie DAD1 und STT3 als Untereinheiten enthält, deren Funktionen noch unklar sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der OST sowie der einzelnen Untereinheiten im OST-Komplex durchgeführt. Ziel war es zum einen Aussagen über die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren zum anderen Hinweise auf die spezifischen Funktionen der Untereinheiten zu erhalten.

Das von Bause & Legler im Jahre 1981 vorgeschlagene Modell zum Katalysemechanismus der OST geht davon aus, daß die N-Glykosylierung durch einen nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des β -Amidstickstoffs von Asparagin an das C1-Atom des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharids stattfindet. Eine Steigerung der Nukleophilie des β -Amidstickstoffs erfolgt durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem β -Amidstickstoff als Donor und der OH-Gruppe von Threonin oder Serin als Akzeptor. Die Hydroxyaminosäure übernimmt im Verlauf der Glykosylierung ein Proton von der β -Amidfunktion und gibt den eigenen Wasserstoff als Proton an eine Base im aktiven Zentrum der OST ab (*Abb. 1-1, Modell A*). Da die Enzymaktivität der OST auf saurer Seite des pH-Optimums relativ steil abfällt (Breuer & Bause 1995), wurde vermutet, daß es sich bei dieser Base z. B. um Histidin handeln könnte. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Histidinseitenketten an der Enzymkatalyse zu erhalten, wurden Hemm-Messungen mit N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon (TLCK), einem spezifischen irreversiblen Inhibitor, der z. B. die Serin-Protease Trypsin durch Modifikation eines Histidinrestes im aktiven Zentrum hemmt (Shaw et al. 1965). Die Aktivitätsmessungen mit Schweinelebermikrosomen, die mit TLCK vorinkubiert wurden, zeigten, daß TLCK zu einer deutlichen Inaktivierung der OST-Aktivität führt. Eine deutlich geringere Inaktivierungsrate wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit des Standardpeptids im Inkubationsansatz beobachtet, was vermuten läßt, daß die Hemmung der OST-Aktivität durch TLCK auf die Modifikation eines Histidinrestes am aktiven Zentrum zurückzuführen ist, eine Interpretation, die mit der pH-Abhängigkeit der N-Glykosylierung

rungsreaktion übereinstimmt. Da die Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit 10 mM TLCK zu einer vollständigen Inaktivierung der OST führte, die durch Zugabe des Standardakzeptortripeptids nicht verhindert werden konnte, ist allerdings davon auszugehen, daß bei sehr hohen TLCK-Konzentrationen die spezifische Modifizierung katalytischer Funktionen am aktiven Zentrum (Histidinseitenketten) durch unspezifische Reaktionen außerhalb des aktiven Zentrums überlagert wird und es hierdurch zu einem Aktivitätsverlust kommt.

In einem anderen experimentellen Ansatz, an der Katalyse/Substratbindung beteiligte Aminosäuren im aktiven Zentrum der OST zu markieren, wurden Hemm-Messungen mit photoaktivierbaren Peptiden durchgeführt. Bartoschek (2000) hatte im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Serie von Tripeptiden synthetisiert, die die Akzeptorsequenz Asn-Xaa-Thr und an verschiedenen Positionen relativ zur Akzeptorsequenz durch UV-Licht aktivierbare 5-Azido-2-Nitrobenzoylgruppen enthielten. Nitroazidobenzoylgruppen reagieren nach Photoaktivierung zum Nitren bevorzugt mit Nukleophilen. Die Hemm-Messungen, die von Bartoschek (2000) durchgeführt wurden, zeigten, daß von den insgesamt fünf synthetisierten Azidopeptiden zwei (Bz-Asn-Orn(N₃NO₂Bz)-Thr-NHMe; N₃NO₂Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe; s. *Abb. 2-10 I und II*) zu einer zeitabhängigen Inaktivierung der OST-Aktivität (15-25 % Hemmung nach 12 min) führten. In Fortsetzung dieser Messungen wurde in der vorliegenden Arbeit in das Hexapeptid Tyr-Asn-Lys-Thr-Ser-Val zwei Azidobenzoylgruppen eingeführt (N-terminal und an die ε-Aminogruppe von Lysin; s. *Abb. 2-10 III*). Hintergrund dieser Experimente war es, einen potentiellen OST-Inhibitor zu erhalten, der ein höheres Hemmpotential besitzt, als die von Bartoschek (2000) synthetisierten Tripeptidderivate. Ziel dieses Ansatzes war es letztlich auf diesem Wege die Inhibitorkonzentration zu reduzieren und so die Gefahr unspezifischer Reaktionen zu minimieren. Die Bestimmung der Akzeptoreigenschaften des Hexapeptids zeigten, daß das diazidobenzoylierte Derivat selbst N-glykosylierbar ist und mit einem K_M-Wert von 120 µM deutlich bessere Bindungseigenschaften besitzt, als das Standardakzeptorpeptid Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe (K_M-Wert = 220 µM). Bestrahlung von Schweinelebermikrosomen in Anwesenheit des diazidobenzoylierten Hexapeptidderivates führte zu einer etwa 10-15 %igen Inaktivierung der Oligosaccharyltransferaseaktivität, die reproduzierbar war und in der gleichen Größenordnung lag, wie sie für das azidohaltige Tripeptid II gemessen wurde. Diese nahezu gleichen Hemmeigenschaften der Derivate II und III lassen den Schluß zu, daß im Falle des diazidobenzoylierten Hexapeptids II die Nitroazidobenzoylgruppe am N-Terminus und nicht die an der ε-Aminogruppe mit

Nukleophilen am aktiven Zentrum reagiert. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß das Derivat IV keine Hemmeigenschaften aufweist. Dies bedeutet letztlich, daß durch das Einführen von zwei Nitroazidobenzoylgruppen in das Hexapeptid das Hemmpotential nicht gesteigert werden konnte.

Der OST-Komplex wurde in den vergangenen Jahren aus verschiedenen Organen und Spezies gereinigt, u. a. aus Hundepankreas (Kelleher et al. 1992), Hühnerovidukt (Kumar et al. 1994) und Schweineleber (Breuer & Bause 1995). Außer dem OST-Komplex aus Schweineleber, der ein zusätzliches 40 kDa Protein enthielt, war die katalytische Aktivität in allen Fällen mit einem hetero-oligomeren Proteinkomplex assoziiert, der OST48, Ribophorin I und Ribophorin II enthielt. Daneben scheint DAD1 - wie Zellfraktionierungsstudien und Quervernetzungsexperimente vermuten lassen - eine weitere Komponente des OST-Komplexes zu sein (Kelleher & Gilmore 1997). Um DAD1 aus Schwein näher zu charakterisieren, wurde die DAD1-spezifische cDNA aus einer Schweineherzmuskel cDNA-Bank kloniert. Durch Screenen der cDNA Bank konnte ein Phagenklon isoliert werden, der ein 658 bp langes Insert enthielt. Das ORF in der „full-length“-cDNA kodiert für ein Protein mit der molekularen Masse von ~12,5 kDa, dessen Aminosäuresequenz zu der von DAD1 aus anderen Spezies hoch homolog ist. Potentielle N-Glykosylierungsstellen vom Typ Asn-Xaa-Thr sind nicht vorhanden. Die Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte & Doolittle (1982) spricht dafür, daß DAD1 eine Typ IV-Membrantopologie besitzt. Zum spezifischen Nachweis von DAD1 wurden polyklonale Antikörper gegen das Gesamtprotein und gegen kürzere Peptide vom N- bzw. C-Terminus in Kaninchen hergestellt, wobei zur Herstellung von Antikörpern gegen das Gesamtprotein DAD1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert wurde. Das ~38 kDa Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisierten Glutathion gereinigt und mit Thrombin in GST und DAD1 gespalten, das DAD1-Fragment wurde durch SDS-PAGE gereinigt und als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Herstellung der Antikörper gegen die synthetischen Peptide wurde von der Firma Pineda übernommen. Überprüfung der verschiedenen Antiseren durch Immunoblotanalyse zeigte, daß sowohl die Antikörper gegen das Gesamtprotein als auch die Antikörper gegen die synthetischen Peptide ein ca. 12 kDa Protein in Schweinelebermikrosomen sowie das nach Thrombinverdau des Fusionsproteins erhaltene DAD1-Fragment erkennen. Die Immunantwort, die mit den Antikörpern gegen das Gesamtprotein bzw. gegen das N-terminale Peptid erhalten wurden, war, im Gegensatz zu der gegen das C-terminale Peptid, jedoch nur äußerst schwach.

Aus diesem Grund wurden nur Antikörper gegen das C-terminale Peptid in der vorliegenden Arbeit zum immunologischen Nachweis verwendet. Eine Ursache für die offensichtlich schlechte Immunantwort der Antikörper könnte sein, daß die antigenen Eigenschaften von DAD1 aufgrund des stark hydrophoben Charakters und/oder der hohen Sequenzhomologie zu DAD1 aus Kaninchen nur mäßig ausgeprägt sind.

Da Versuche DAD1 als „Wildtypprotein“ in COS 1-Zellen zu synthetisieren nicht erfolgreich waren (möglicherweise wirken sich die stark hydrophoben Eigenschaften bzw. die komplexe Membrantopologie von DAD1 negativ auf die Expressionsausbeute aus) wurde DAD1 zu näheren Charakterisierung als Fusionsprotein mit GFP in COS 1-Zellen synthetisiert. Transfektion von COS 1-Zellen mit der DAD1-GFP-spezifischen cDNA führte, wie durch Immunoblotanalyse nachgewiesen werden konnte, zur Überexpression eines ca. 41 kDa großen Proteins. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation durch Immunofluoreszenzmikroskopie zeigten, daß das DAD1-GFP-Fusionsprotein in COS 1-Zellen als ER-residentes Protein exprimiert wird. Da GFP selbst als cytosolisches Protein exprimiert wird, ist anzunehmen, daß die Strukturinformationen für die ER-Lokalisation von DAD1-GFP in der DAD1 Polypeptidkette enthalten sind. Da bisher bekannte Retentions- bzw. Retrievalsignale in der Aminosäuresequenz von DAD1 fehlen, muß DAD1 durch andere bisher nicht bekannte Mechanismen im ER zurückgehalten werden. Denkbar wäre, daß die ER-Lokalisation von DAD1 durch Interaktion mit anderen Untereinheiten des OST-Komplexes vermittelt wird, wie dies z. B. im Falle der ER-Lokalisation von OST48 und Ribophorin I nachgewiesen wurde (Fu & Kreibich 2000, Hardt et al. 2001).

Um den Einfluß von OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 für die Ausbildung katalytischer Aktivität zu untersuchen, wurden Expressionsstudien in COS 1-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden COS 1-Zellen mit Vektorkonstrukten transfiziert, bei denen die cDNAs von OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1-GFP in entsprechende Expressionsvektoren (pcDNA3 bzw. pSVSport.1) einkloniert wurden und die überexprimierten Untereinheiten anschließend durch Immunoblotanalyse und Aktivitätsmessungen charakterisiert. Wie die Ergebnisse der Immunoblotanalysen zeigten, wurden alle vier Untereinheiten stark überexprimiert, jedoch wies keine katalytische Aktivität auf. Dies spricht dafür, daß an der Ausbildung katalytischer Aktivität mehrere (mindestens 2) Untereinheiten beteiligt sein müssen. Diese Annahme wird durch frühere Arbeiten von Breuer & Bause (1995) im Zusammenhang mit der Reinigung der OST aus Schweineleber, sowie durch Untersuchungen des hetero-dimeren Gucosidase II-Komplexes, der

aus einer katalytischen α -Untereinheit und einer nicht-katalytischen β -Untereinheit besteht, erhärtet. Während die α -Untereinheit alleine in COS 1-Zellen als inaktives Protein synthetisiert wurde, führte erst die Koexpression mit der β -Untereinheit zu einem katalytisch aktiven Glucosidase II-Komplex (Trembl et al. 2000). Um die Beteiligung einzelner Untereinheiten des OST-Komplexes an der Ausbildung katalytischer Aktivität nachzuweisen, wurden deshalb COS 1-Zellen mit der OST48 und der Ribophorin I-spezifischen cDNA kotransfiziert. Die Koexpression beider Untereinheiten führte in der Tat zu einem etwa 1,8fachen Anstieg der OST-Aktivität. Dies läßt den Schluß zu, daß OST48 und Ribophorin I offensichtlich beide für die enzymatische Aktivität essentiell sind, wobei unklar bleibt, welchen spezifischen Beitrag sie jeweils an der Katalyse bzw. Substratbindung leisten. Die nach Koexpression von OST48 und Ribophorin I erhaltene OST-Aktivität konnte weder durch gleichzeitige Anwesenheit von Ribophorin II noch DAD1 weiter gesteigert werden. Dies läßt vermuten, daß DAD1 und Ribophorin II andere Funktionen im OST-Komplex übernehmen. Denkbar wäre, daß erst die Zusammenlagerung aller Untereinheiten zu einem voll aktiven Enzymkomplex führt und hierbei eine genau definierte Abfolge von Biosynthese-, Faltungs- und Assoziationsschritten eingehalten werden muß.

Da die in COS 1-Zellen synthetisierbaren Proteinmengen äußerst gering waren und darüber hinaus die endogene OST-Aktivität in den Zellen relativ hoch ist, sollte versucht werden OST48 und Ribophorin I (als potentiell katalytische Untereinheiten) in größeren Mengen unter zellfreien Bedingungen zu synthetisieren und diese zu einem aktiven Enzymkomplex zu rekonstituieren. Zur Synthese beider Untereinheiten wurde ein gekoppeltes *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem eingesetzt, das mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase und eines *E. coli*-Lysats arbeitet. Um die Expressionsausbeuten im *E. coli*-Lysat zu optimieren, wurde die OST48- bzw. Ribophorin I-spezifische cDNA durch Einführung sogenannter stiller Mutationen im 5'-kodierenden Bereich modifiziert. Solche Kodonoptimierungen werden gemacht, um basenspezifische Einflüsse, die die Syntheseraten von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* zum Teil stark reduzieren können, zu umgehen. Die Programmierung des RTS-Systems mit den verschiedenen OST48- bzw. Ribophorin I-spezifischen cDNA-Varianten führten in der Tat zu erheblich unterschiedlichen Translationsraten, was den Einfluß des 5'-kodierenden Bereichs auf die Expressionsausbeute dokumentiert. Die OST48- bzw. Ribophorin I-spezifischen cDNA-Varianten, die die größten Proteinmengen lieferten, wurden in einen Expressionsvektor inkloniert und diese als Templates eingesetzt. Die OST48- und Ribophorin I-spezifi-

sche cDNA wurde zudem so modifiziert, daß der für die Signalsequenz kodierende Basenbereich deletiert wurde, um einen möglicherweise negativen Einfluß der Signalsequenz auf die Assoziation der Untereinheiten auszuschließen. Die enzymatischen Messungen mit *E. coli*-Lysaten, die das translatierte OST48 bzw. Ribophorin I Protein enthielten, zeigten, daß nach Inkubation mit Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ die lipidgebundene Chitobiose durch im Lysat vorhandene Aktivitäten zu einem beträchtlichen Anteil unspezifisch in eine wasserlösliche Form überführt wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung (die letztlich eine exakte Messung der OST-Aktivität verhinderte) wäre, daß im *E. coli*-Lysat vorhandene Transferasen die Dol-PP-Chitobiose als Substrat erkennen und auf endogene Akzeptoren übertragen, die dann wasserlöslich sind. Hierfür sprechen in der Tat Untersuchungen von Wacker et al. (2001), die herausfanden, daß z. B. N-Glykosylierungen auch bei Prokaryonten ablaufen. Der Oligosaccharidvorläufer wird dabei über Bactoprenol, einem Polyisoprenylalkohol mit ähnlicher Struktur wie Dolichol, vermutlich aktiviert. Ferner wurde in *Campylobacter jejunii* ein dem STT3 homologes Protein identifiziert, das für die Übertragung der lipidgebundenen Oligosacchride auf Proteine verantwortlich sein soll. Da die im RTS-Lysat mit dem Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂-Donor durchgeführten Messungen keine aussagekräftigen Ergebnisse zuließen, wurde anstelle der Dol-PP-gebundenen Chitobiose Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-G₃ als natürliches Substrat für die Aktivitätsmessungen eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde nach Kotranslation von OST48 und Ribophorin I eine 20-25 % erhöhte OST-Aktivität gemessen, die nach Einzelexpression beider Untereinheiten nicht zu beobachten war. Diese Aktivitätssteigerung steht im Einklang mit den Ergebnissen der Expressionsstudien in COS 1-Zellen und sprechen in der Tat dafür, daß OST48 und Ribophorin I unmittelbar am Transglykosylierungsschritt beteiligt sind. Für die nur mäßige Aktivitätssteigerung im RTS100, trotz hoher Syntheseausbeuten an OST48 und Ribophorin I, lassen sich verschiedene Gründe anführen: (i) der aus OST48 und Ribophorin I bestehende katalytisch aktive Komplex ist äußerst instabil. Dafür spricht die Beobachtung, daß eine aus OST48 und Ribophorin I bestehende Enzympräparation, die nach Abtrennung von Ribophorin II und OST40 erhalten wurde, außerordentlich schnell seine katalytische Aktivität verlor (Breuer & Bause 1995). (ii) Die nicht direkt an der Katalyse beteiligten Untereinheiten sind für die Stabilisierung der durch OST48/Ribophorin I-vermittelten OST-Aktivität essentiell. (iii) An der Ausbildung „optimaler“ katalytischer Aktivität sind neben OST48 und Ribophorin I noch weitere Untereinheiten beteiligt.

Obwohl in gereinigten Enzym-Präparationen bisher nicht nachgewiesen, scheint STT3, eine weitere Komponente des OST-Komplexes zu sein (Yoshida et al. 1995; Karaoglu et al. 1997). So zeigen Arbeiten von Yan & Lennarz (2002), daß STT3 zumindest in Hefe eine zentrale Rolle bei der Erkennung der glykosylierbaren Peptide zu haben scheint und so vermutlich direkt an der Katalyse beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die cDNA von STT3 kloniert. Die erhaltene 2450 bp lange STT3-cDNA enthält ein 2115 bp langes offenes Leseraster, das für 705 Aminosäuren entsprechend einem Protein von 78 kDa kodiert. Die Ergebnisse der Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte & Doolittle (1982) lassen am N-Terminus einen hydrophoben Bereich von 30 Aminosäuren erkennen, der vermutlich als Signalsequenz dient. Darüber hinaus sind in der Polypeptidkette 10-12 hydrophobe Sequenzbereiche erkennbar, die zur Membranverankerung dienen könnten. Das STT3 Protein enthält drei potentielle N-Glykosylierungsstellen vom Typ Asn-Xaa-Thr (Asn-381, Asn-537, Asn-548). Orientierende Versuche zeigten, daß STT3 in COS 1-Zellen als katalytisch inaktives Protein synthetisiert wird. Weitere Untersuchungen zur Funktion von STT3 im OST-Komplex konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

4 Zusammenfassung

Oligosaccharyltransferase, ein Schlüsselenzym der N-Glykoproteinbiosynthese, überträgt Dol-PP-aktivierte Oligosaccharide auf spezifische Asparaginreste der wachsenden Polypeptidkette, sofern die entsprechenden Akzeptoraminosäuren innerhalb einer Signalsequenz vom Typ Asn-Xaa-Thr/Ser liegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht durch chemische Modifizierung von Aminosäuren und mit Hilfe potentieller Inhibitoren Hinweise auf die Strukturen des aktiven Zentrums zu erhalten. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der verschiedenen Untereinheiten im OST-Komplex durchgeführt.

- Hemm-Messungen mit TLCK, einem Reagenz, das mit Imidazolgruppen von Histidinresten reagiert, zeigten, daß die OST-Aktivität zeit- und konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Eine deutlich geringere Aktivitätsrate wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit des Akzeptorsubstrats Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe gemessen. Diese Beobachtungen sprechen für das Vorhandensein eines Histidinrestes am aktiven Zentrum der OST und für dessen Beteiligung an der Katalyse, eine Interpretation, die durch die pH-Abhängigkeit der OST-Aktivität unterstützt wird.
- Akzeptormessungen mit einem Tyr-Asn-Lys-Thr-Ser-Val Hexapeptid, das an der α -Aminogruppe von Tyrosin und an der ϵ -Aminofunktion von Lysin jeweils eine photoaktivierbare 5-Azido-2-nitrobenzoylgruppe trug, zeigten, daß das Derivat von der OST gebunden (K_M -Wert $\sim 120 \mu\text{M}$) wird und N-glykosylierbar ist. Bestrahlung der Inkubationsansätze (bei 366 nm) führten zu einer zeitabhängigen Inaktivierung der OST-Aktivität (15 % nach 15 min). Ein Vergleich der Inaktivierungsrate mit Ergebnissen, die mit nitroazidobenzoylhaltigen Tripeptiden erhalten wurden, sprechen dafür, daß nur die an der α -Aminogruppe des Hexapeptids nach Photoaktivierung mit einem nukleophilen Partner am aktiven Zentrum der OST reagiert.
- Um Untersuchungen zur Funktion der Untereinheiten im OST-Komplex zu ermöglichen, wurde die DAD1- und die STT3-spezifische cDNA kloniert. Aus den erhaltenen Sequenzdaten ergibt sich, daß das DAD1-Protein 113 Aminosäuren (Molmasse 12,5 kDa) und das STT3-Protein 705 Aminosäuren (Molmasse 78 kDa) enthalten. Beide Proteine enthalten mehrere hydrophobe Sequenzbereiche, die vermutlich als Transmembrandomänen dienen.

Zur näheren Charakterisierung von DAD1 wurden COS 1-Zellen mit einem cDNA-Konstrukt transfiziert, das für ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und DAD1 kodierte.

Mit Hilfe DAD1-spezifischer Antikörper, die gegen das Gesamtprotein bzw. gegen Teilpeptide hergestellt wurden, konnte eine effektive Überexpression des DAD1-GFP-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Immunfluoreskopische Untersuchungen zeigten darüber hinaus, daß DAD1-GFP in COS 1-Zellen als ER Protein exprimiert wird.

- Aktivitätsmessungen mit den in COS 1-Zellen überexprimierten Untereinheiten OST48, Ribophorin I, Ribophorin II und DAD1 zeigten, daß keine der vier Untereinheiten für sich alleine katalytische Aktivität besaß. Im Gegensatz hierzu führte die Koexpression von OST48 und Ribophorin I zu einer etwa 1,8fachen Erhöhung der OST-Aktivität gegenüber Kontrollzellen. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß sowohl OST48 als auch Ribophorin I für die Ausbildung katalytischer Aktivität essentiell sind. Weder die gleichzeitige Anwesenheit von Ribophorin II noch von DAD1 führte zu einer weiteren Erhöhung der mit OST48/Ribophorin I assoziierten Aktivität, was dafür spricht, daß diesen Untereinheiten möglicherweise eine andere Funktion im OST-Komplex zukommt.
- Um die in COS 1-Zellen erhaltenen Ergebnisse unter zellfreien Bedingungen zu reproduzieren, wurden OST48 und Ribophorin I in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem RTS100 synthetisiert. Messungen mit den entsprechenden Lysaten unter Verwendung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe und DoI-PP-[¹⁴C]Oligosacchariden als Substraten zeigten, daß vergleichbar den Ergebnissen in COS 1-Zellen keine der Untereinheiten für sich alleine katalytische Aktivität aufwies, während Lysate, die sowohl OST48 als auch Ribophorin I enthielten, zu einer reproduzierbaren Peptidglykosylierung führten.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 400, Firma H+P Labortechnik
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD (Semi-Dry Transfer Cell), Firma Biorad
Brutschrank	Typ BB18 CU, Firma Heraeus
Fraktionssammler	Superrac 2211, Pharmacia, Helirac 2212 Pharmacia
Gelapparaturen	
-Agarosegele	Agagel G45; Firma Biometra
-SDS-Polyacrylamid	Protean II xi Cell, Mini-Protean II Cell, Firma Biorad
-Sequenzgele	Macrophor, Firma Pharmacia
Geltrockner	Gel Dryer 543, Firma Biometra
Kameras	Mikroskopkamera MC80 und Belichtungssteuerung, Firma Zeiss, Polaroid-Kamera Armaf TA 40
Mikroskope	Lichtmikroskop Wilovert S, Firma Hund, Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Axiolab, Firma Zeiss
pH-Meter	pH-Meter 761, Firma Knick
Photometer	Spektrophotometer Ultrospec Plus, Firma Pharmacia
Polaroid-Kamera	Armaf TA 40
Potter	Elvehjem-Homogenisator, Braun
Schüttelinkubator	GFL 3032, Biorad
Schüttelwasserbad	Typ SW-20C, Julabo; GFL
Sequenzier	Abi-Prism 310 Genetic Analyzer, Firma Perkin Elmer Biosystems
Sterilbank	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2448, Firma Heraeus
Spannungsgeräte	Desaga Spannungsquelle, Modell 3000xi, Biometra
Szintillationszähler	1900CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, Firma Canberra Packard
Thermocycler	Trio-Thermoblock, Firma Biometra
Ultraschallgerät	Bandelin Super RK 510, SONOREX
Ultra-Turrax	T45, Janke & Kunkel KG
UV-Transilluminator	2011 Macrovue, Firma Pharmacia LKB
Zentrifugen	Biofuge 15R, Heraeus Sepatech;

Ultrazentrifugen L2 und L7 mit Rotoren 45 Ti und SW 28, Beckmann;
Kühlzentrifuge RC2-B mit Rotor GS-3, Sorvall;
Kühlzentrifuge J-6B mit Rotor JS-4.2, Beckmann;
Tischzentrifuge 3-12 mit Rotor Nr. 11133 Sigma, 5415C Zentrifuge, Eppendorf

5.2 Materialien

Amersham-Biosciences:

Nylon Rundfilter (Ø 82 und 132 mm); Nylonmembran, Amplify; Superdex™200 prep grade, UDP-[¹⁴C]GlcNAc

Bachem:

H-Leu-cholormethylketon, H-Phe-chloromethylketon, Tosyl-Phenylalanin-chlormethylketon, N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon

Beckmann:

Ultraclear-Zentrifugenröhrchen

Biorad:

30 % Acrylamid/Bis-Lösung (29:1), TEMED

Biozym Diagnostik GmbH:

Gestopfte Spitzen 19 µl, 20 µl, 100 µl und 1000µl

Clontech:

cDNA-Bank aus menschlicher Leber (HL 3006a) in λgt10

Dako, Hamburg:

Ziege-anti-(Kaninchen)-Antikörper mit DTAF konjugiert, Ziege-anti-(Maus)-Antikörper mit Rhodamin (TRITC) konjugiert

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen:

COS 1-Zellen

Difco:

Bacto-Trypton, Hefeextrakt

Eastman-Kodak, New York, USA:

Röntgenfilm X-Omat AR 5

Eppendorf:

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml

Fluka:

Ammoniumacetat, EDTA, Essigsäure, Glycin, Mercaptoethanol, Mowiol, Natriumazid, Methyl- α -D-mannopyranosid, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Triton X-100, Tween 20

Gibco-BRL:

Antibiotic-Medium AB₃, Agarose Elektrophorese grade, DMEM-Medium, DNA-Größenmarker, *E.coli*-Stamm DH5 α , Fötales Kälberserum, PCR-Kit, Plasmid pSVSport.1, Taq-Polymerase, Select Pepton 140, Select-Yeast-Extract, synthetische Oligonukleotid-Primer,

Greiner:

Petrischalen 100/20 mm, Spitzen 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l und 1000 μ l

Hartmann Analytic GmbH:

[α ³²P]-dATP (spez. Akt. >3000 Ci/mmol), [γ ³²P]-ATP (spez. Akt. >3000 Ci/mmol), [³H]-Mannose, [³⁵S]-L-Methionin (spez. Aktivität > 1000 Ci/mmol)

ICN:

Harnstoff (ultrapure), HEPES, 96 Well-Mikrotiterplatte

Invitrogen:

Expressionsvektor pcDNA3, TOPO TA Cloning Kit

LKB-Pharmacia:

DEAE-Dextran, Glutathion-S-Sepharose 4B, p-GEX-4T1, T7-Sequencing Kit

Macherey-Nagel:

DNA-Isolierungskit, Nucleospin Extract

MBI Fermentas GmbH:

Restriktionsendonukleasen, Prestained Proteinladder ~10-180 kDa

Merck:

Ammoniumperoxiddisulfat, Bromphenolblau, Calciumchlorid, DMF, Ethanol, Folin-Ciocalteus- Phenolreagenz, Glycerin, HEPES, Isopropanol, Kaliumfluorid, Kaliumnatriumtartrat, Kupfersulfatpentahydrat, Manganchlorid, Methanol, Natriumacetat, Natriumcarbonat Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Nitrophenylphosphat Xylenxyanol,

NEB:

Restriktionsendonukleasen, anti-(myc)-Antikörper, anti-(His)-Antikörper

Pierce:

Lumi-PhosTMWB

Pineda:

Peptidsynthese DAD1, Antikörpergewinnung und –reinigung anti-(DAD1)-Antikörper

Polaroid:

Polaroid 667 Sofortbilder

Quiagen GmbH:

Lambda Kit, prep Spin Plasmid-Kit

Roche:

Ribonuklease A, Desoxyribonuklease, Oligo-dT-Cellulose, T4-DNA-Ligase, „rapid ligation kit“, RTS100 *E.coli* HY Kit, linear Template Generation Set (His tag), Pwo DNA Polymerase, Leupeptin, Pepstatin

Roth:

Ampicillin

Sarstedt:

Polypropylenröhrchen (50 ml), Polystyrolröhrchen mit Schraubenverschluß (15 ml), Einmalspritzen 20 und 50 ml, Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm

Schleicher & Schüll:

Nitrocellulosemembran, Sterilfilter

Serva-Promega:

5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxylphosphat, Comassie Brilliant Blue R-250 und G-250, Magic Miniprep Kit, Mercaptoethanol, Prime-a-Gene-labeling-System, Natriumdodecylsulfat, TEMED, Rinderserumalbumin, Nitroblautetrazoliumchlorid, Ponceau S, Tween 20

Sigma:

Adenosintriphosphat, Ampicillin, Bromacetylcholinbromid, Chloroquin, DABCO, DEAE-Dextran, Dolicholphosphat, Ethidiumbromid, Freund'sches Adjuvans, Formaldehyd, Formamid, Guanosintriphosphat, IPTG, Lysozym, Natriumdesoxycholat, Ovalbumin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidsäure, Thrombin Trypsin, UDP-GlcNAc, X-Gal, Ziege-anti-(Kaninchen)-Antikörper alkalische Phosphatase konjugiert, Ziege-anti-(Maus)-Antikörper alkalische Phosphatase konjugiert

Stratagene GmbH:

PBluescript II SK phagemid, cDNA-Bank aus Schweine-Aorta (#937700), *E.coli* XL 1 blue MRF'

United States Biochemical, Cleveland:

Rnase-freies Wasser

Whatman, GB:

Chromatographiepapier 3 MM

5.3 Isolierung von Schweinelebermikrosomen

Zur Isolierung der Mikrosomen wurde Schweineleber in kleine Stücke zerteilt und in 0,25 M Sucroslösung (400 ml/100 g) mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Nach anschließender Abfiltrierung des Bindegewebes wurde die Leber im Elvehjem-Potter viermal bei 4°C homogenisiert. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 12 000xg für 30 min wurden Zelltrümmer, Zellkerne, Mitochondrien und Lysosomen abgetrennt, der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet verworfen und die Mikrosomen aus dem Überstand durch Zentrifugation bei 48 000xg für 120 min sedimentiert. Das so erhaltene mikrosomale Pellet wurde 1:1 (w/v) in 0,25 M Sucrose aufgenommen. Die Mikrosomensuspension ist bei -20°C haltbar.

5.4 Enzymatische Messungen

5.4.1 Darstellung von Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose und Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃

Dol-PP-[¹⁴C]Chitobiose

Zur Synthese lipidgebundener-[¹⁴C]Chitobiose wurden zunächst folgende Komponenten zusammengegeben:

2000 cpm Dol-P (eingetrocknet aus Chloroform/Methanol; 2:1; v/v)	
20 µl	4 % Triton X-100 in 100 mM Tris, pH 7,3
10 µl	200 mM MnCl ₂
10 µl	150 mM KF
10 µl	30 mM GTP
10 µl	15 mM ATP
5 µl	UDP-[¹⁴ C]GlcNAc (300 000 cpm)

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 30 µl Kalbslebermikrosomen (1:1 in 0,25 M Sucrose) gestartet und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 20 µl nicht markiertem UDP-GlcNAc (20 mg/ml) versetzt und weitere 30 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 500 µl Methanol abgestoppt, mit 100 µl Wasser und 750 µl Chloroform versetzt und nach Mischen 10 min bei 1000 xg zur Phasentrennung zentrifugiert. Die chloroformhaltigen Unterphasen wurden abgenommen und dreimal mit dem gleichen Volumen Folch-Oberphase (H₂O/Methanol/Chloroform/1

M MgCl_2 ; 96/94/6/0,8) gewaschen und vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Chloroform/Methanol (2:1; v/v) aufgenommen.

Dol-PP-GlcNAc₂-M₉-[¹⁴C]G₃

Zur Synthese wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

100 µl	200 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2,2 M NaCl
10 µl	50 mM CDP-Cholin
10 µl	220 mM Mercaptoethanol
20 µl	100 mM Mg-EDTA in 100 mM MgCl_2
10 µl	170 mM ATP
10 µl	17 mM AMP
10 µl	1 mM UDP-N-Acetylglucosamin
5 µl	UDP-[¹⁴ C]-Glucose (25 µCi/ml)

Die Reaktionen wurden durch Zusatz von je 250 µl Schweinehirn-Mikrosomen (1:1 in 0,25 M Sucrose) gestartet und 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zusatz von 1 ml Methanol abgestoppt und mit 200 µl Wasser und 1,5 ml Chloroform versetzt und nach Mischen 10 min bei 13 000xg zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase und die chloroformhaltige Unterphase wurden entfernt und die Interphase, die die Membranroteine und Dol-PP-[¹⁴C]Oligosaccharide enthielt, wurde dreimal mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) und dreimal mit Methanol/Wasser (1:2; v/v) gewaschen. Dann wurden die Dol-PP-[¹⁴C]Oligosaccharide durch zweimaliges Ausschütteln (30 bzw. 15 min) mit Chloroform/Methanol/Wasser (10:10:3; v/v/v) aus der Interphase extrahiert und die Überstände vereinigt. Die Einbaurate von [¹⁴C]Glucose in die Dol-PP-Oligosaccharide betrug 10-15 %, bezogen auf die eingesetzte Menge an UDP-[¹⁴C]-Glucose.

5.4.2 Standardassay nach Bause (1979)

Zur Messung der OST-Aktivität wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

2000 cpm Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₂ aus Chloroform/Methanol (2/1; v/v) eingetrocknet

10 µl	50 mM MnCl_2
10 µl	5 % Triton-X-100 in 200 mM Tris/HCl pH 7,4
10 µl	Peptidlösung
20 µl	Mikrosomensuspension

Die Messungen erfolgten bei einer Peptidkonzentration von 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Mikrosomen gestartet und für ca. 10-15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl Methanol wurde die Enzymreaktion gestoppt.

Der Glykosylierungsansatz wurde 3 min bei 1000xg zentrifugiert, der erhaltene Überstand abgenommen, auf Chloroform/Methanol/Wasser (3:2:1; v/v/v) eingestellt und zur Phasentrennung erneut zentrifugiert. Der ^{14}C -Glykopeptidgehalt in der wässrigen Oberphase wurde anschließend am Szintillationszähler ermittelt.

5.4.3 Modifizierter Assay nach Breuer & Bause (1995)

Die OST-Aktivität wurde durch Inkubation von DoI-PP- ^{14}C GlcNAc₂ (2000 cpm) als Glykosyldonor bei 1 mM Peptidkonzentration (Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe) im Assay (Gesamtvolumen 100 µl) folgender Zusammensetzung gemessen:

50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
10 mM	MnCl ₂
1 %	Triton-X-100
0,5 M	Natriumacetat
1 M	Sucrose
0,3 M	Methyl- α -mannosid
0,3 %	Phosphatidylcholin

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (50 µl OST-Präparation) gestartet, 5, 10 und 20 min bei 25 °C inkubiert und durch Zusatz von 500 µl Methanol abgestoppt. Der Inkubationsansatz wurde wie in 5.4.2 beschrieben aufgearbeitet und die ^{14}C -Transferate am Szintillationszähler ermittelt.

5.4.4 Hemm-Messungen

Um die Fähigkeit potentieller Inhibitoren zur Inaktivierung der OST zu messen, wurde das Enzym in Form von Mikrosomen in Anwesenheit verschiedener Inhibitorkonzentrationen vorinkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität zu verschiedenen Zeiten durch Messung der Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe bestimmt.

Bei Bestrahlungsexperimenten mit Photopeptiden wurden die Inkubationsansätze, die aufgrund der schlechten Löslichkeit der Peptide DMSO (10 % Endkonzentration) ent-

hielten, mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt und die Restaktivität im Standardassay nach Bause (1979) bestimmt. Die Bestrahlungsexperimente wurden in Küvetten aus Quarzglas durchgeführt, die 1 cm vor einer UV-Handlampe platziert wurden.

Vorinkubation:

60 µl	5 % Triton-X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 M Sucrose
60 µl	100 mM Tris/HCl, pH, 7,4, 1 M Sucrose
40 µl	MnCl ₂
40 µl	Lösung des potentiellen Inhibitors
200µl	Mikrosomen

Nach Inkubation bei RT wurde zu den angegebenen Zeiten folgender Assay durchgeführt:

2000 cpm	Dol-PP-[¹⁴ C]GlcNAc ₂
10 µl	5 % Triton-X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1M Sucrose
10 µl	MnCl ₂ (30 mM)
10 µl	Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe (20 mM)
70 µl	Inaktivierungsansatz

Nach halbstündiger Inkubation bei 20 °C wurde der Assay wie unter 5.4.2 beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

5.4.5 Radioaktivitätsmessung

Zur quantitativen Messung der radioaktiven Proben wurde ein von Bray (1960) beschriebener Szintillationscocktail verwendet, der folgende Zusammensetzung hatte:

60 g	Naphthalin
4 g	2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0,2 g	1,4-Bis(5-phenyloxazol-2-yl)-benzol
20 ml	Ethylenglykol
100 ml	Methanol
auf 1 L mit Dioxan	

Maximal 1 ml Probe wurde mit 5 ml Szintillationscocktail vermischt und je nach Radioaktivitätsmenge bis zu 30 min gezählt.

5.5 Allgemeine analytische Methoden

5.5.1 Proteinbestimmung nach Lowry (Wang & Smith 1975)

Die Proteinbestimmung wurde mittels der von Lowry (Wang & Smith 1975) beschriebenen Methode durchgeführt, die es erlaubt Proteinkonzentrationen in Gegenwart von Detergenzien zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte mittels eines Standards aus Rinderserumalbumin (0-25 µg), der zur Erstellung einer Eichkurve diente.

400 µl der zu bestimmenden Proteinproben wurden mit 400 µl Lösung D gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Hierzu wurden 200 µl Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz (1:5 verdünnt mit Wasser) gegeben und sofort gemischt. Nach 60 min erfolgte die Bestimmung der Extinktion (720 nm) gegen Wasser.

Chemikalien

- Lösung A: 0,5 g Kupfersulfatpentahydrat, und 1 g Kaliumnatriumtartrat in 500 ml 10 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung
- Lösung B: 10 % SDS
- Lösung C: 0,8 N Natronlauge
- Lösung D: Lösung A/Lösung B/Lösung C/Wasser im Verhältnis 1/1/1/1

5.5.2 Proteinfällung mittels Chloroform/Methanol

Die Proteinfällungen zur Aufkonzentrierung stark verdünnter Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Wessel & Flügge (1984).

Hierzu wurde bis zu 400 µl Probe (kleinere Probenvolumina wurden mit entsprechender Menge Wasser versetzt) mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt. Danach wurde zur Phasentrennung 5 min bei 10 000xg zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde abpipettiert und verworfen, die Unterphase sowie die proteinhaltige Interphase mit 500 µl Methanol versetzt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde der Methanol/Chloroform Überstand vorsichtig abgenommen, die Proteinpellets getrocknet und in Puffer gelöst. Zur Fällung größerer Probenvolumina wurde das Volumen der Ansätze vergrößert

5.5.3 Nachweis von Proteinen

5.5.3.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Gelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei werden Proteine in Gegenwart von 0,1 % SDS (w/v) aufgrund ihres Molekulargewichts während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode getrennt.

Zur Herstellung eines 12 %igen Trenngels wurden 3 ml Trenngelpuffer, 2,4 ml Acrylamidlösung, 0,6 ml Wasser, 20 µl APS und 5 µl TEMED gemischt. Die Lösung wurde in die Gelkammern bis zu einer Höhe von 4 cm eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde der Alkohol abgegossen und das Sammelgel, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt wurde, aufpolymerisiert. Das 4,5 %ige Sammelgel setzte sich aus 1 ml Sammelgelpuffer, 0,75 ml Wasser, 0,3 ml Acrylamidlösung, 10 µl APS-Lösung und 5 µl TEMED zusammen.

Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und zur Denaturierung 5 min bei 100°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das untere Gelende erreicht hatte.

Elektrodenpuffer	0,192 M Glycin, 0,025 M Tris-Base, pH 8,3, 0,1 % SDS
Sammelgelpuffer	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,2 % SDS
Trenngelpuffer	0,75 M Tris/HCl pH 8,8, 0,2 % SDS
Probenpuffer	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 10 % Mercaptoethanol, 0,004 % Bromphenolblau
Acrylamidlösung	29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid pro 100 ml wässrige Lösung
APS	10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS) in H ₂ O

5.5.3.2 Tricine-SDS-PAGE nach Schägger & Jagow (1987)

Mit Hilfe der Tricine-SDS-Gelelektrophorese können Proteine/Peptide in einem Bereich von 1-100 kDa aufgetrennt werden. Hierzu wurde die gleiche Elektrophorese-Apparatur wie bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) benutzt.

Lösungen:

Anodenpuffer	0,2 M Tris/HCl pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricine pH 8,25 (nicht nachstellen)
Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % SDS
Probenpuffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 8 % SDS, 8 M Harnstoff, 100 mM DTT, 0,004 % Bromphenolblau
Acrylamidlösung	29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid pro 100 ml wäßrige Lösung
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS) in Wasser

Das Gel setzte sich zusammen aus Trenngel (16 %), Spacergel (10 %) und Sammelgel (4 %). Für ein Minigel mit 1 mm dicken Spacern wurden 4 ml Trenngellösung, 0,8 ml Spacergellösung und 1,2 ml Sammelgellösung benötigt.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Trenngel:	2 g Glycerin, 5 ml Acrylamidlösung, 5 ml Gelpuffer wurden auf 15 ml mit Wasser aufgefüllt und die Polymerisation mit 75 µl APS und 7,5 µl TEMED gestartet
Spacergel:	3,05 ml Acrylamidlösung, 5 ml Gelpuffer und 6,95 ml Wasser wurden gemischt und die Polymerisation mit 50 µl APS und 5 µl TEMED gestartet
Sammelgel:	0,5 ml Acrylamidlösung, 1,55 ml Gelpuffer und 4,2 ml Wasser wurden gemischt und die Polymerisation mit 50 µl APS und 5 µl TEMED gestartet.

Das vollständig polymerisierte Gel wurde in die Apparatur eingespannt und Puffertanks mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden 5 min bei 100°C erhitzt und in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Die Elektrophorese wurde 1 Stunde bei 30 Volt und so lange bei 80 Volt durchgeführt, bis der Blaumarker den unteren Bereich des Trenngels erreicht hatte.

5.5.3.3 Coomassie-Färbung

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine lassen sich durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar machen. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt bei 1 µg sichtbarem Protein. Hierzu wurde das Polyacrylamid Gel in einer Lösung aus 50 % Methanol, 12 % Essigsäure und 0,1 % Coomassie Brilliant Blue-G eine Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde solange mit 40 % Methanol/5 % Eisessig gewaschen bis der Hintergrund farblos erschien und nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel im Gelrockner für 2 h bei 80°C getrocknet.

5.5.3.4 Silberfärbung nach Harlow & Lane (1987)

Die Färbung von Proteinen im Polyacrylamid Gel durch Silber-Färbung ist sensitiver als die Färbung mit Coomassie-Blau und wird angewandt, um geringere Mengen an Protein (2-5 ng/Proteinbande) zu detektieren.

Zunächst wurde das SDS-Gel in einer Lösung aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure für mindestens 3 h fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und das Gel 2 mal für 30 min mit 30 % Ethanol und 3 mal für je 10 min mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde in einer 0,1 % Ag_2NO_3 Lösung für 30 min inkubiert, für 20 sec unter Wasser gewaschen und anschließend in 2,5 % Natriumcarbonat/0,02 % Formaldehyd entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch 1 % Essigsäure abgestoppt, das Gel mehrfach mit Wasser gewaschen und in einem Gelrockner für 2 h bei 80°C getrocknet.

5.5.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Towbin 1979)

Bei dieser Methode erfolgt unmittelbar nach Abschluß der Gelelektrophorese der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran sowie Whatman-3MM-Chromatographiepapier auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit dem Polyacrylamidgel für 10 min in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert. Anschließend wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Anodenplatte übereinandergelegt: Chromatographiepapier, die Nitrocellulosemembran, das Polya-

crylamidgel und eine weitere Lage Chromatographiepapier. Nach Schließen der Apparatur wurde der Transfer für eine Stunde bei 10 Volt durchgeführt.

5.5.3.6 Ponceau-Färbung

Die an Nitrocellulose gebundenen Proteine können durch Anfärbung mit Ponceau S sichtbar gemacht werden. Die Färbung wird zur Überprüfung der Bloteffizienz benutzt und ist nicht permanent, in der Regel kann der Farbstoff durch Waschen mit PBS-T (PBS, 0,05 % Tween 20) wieder vollständig entfernt werden.

Zur Anfärbung wurde der Blot für 10 min in 0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA inkubiert. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde anschließend mit Wasser abgewaschen.

5.6 Immunologische Methoden

5.6.1 Herstellung von Antikörpern gegen DAD1

5.6.1.1 Antigenherstellung durch Expression von DAD1 in *E. coli*

Da ausreichende Mengen des DAD1-Proteins durch Reinigung aus Schweineleber nicht zu gewinnen waren, wurde DAD1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase in *E. coli* synthetisiert.

Zuerst wurde DAD1 aus dem Vektorkonstrukt pSV-DAD1 durch einen Verdau mit EcoRI und NotI herausgeschnitten. Das Fragment wurde dann in den Expressionsvektor pGEX-4T1, der ebenfalls mit EcoRI und NotI geschnitten wurde, einkloniert. Der so erhaltene rekombinante Klon (pGEXDAD1) wurde in *E. coli* DH5 α transformiert. Zur Expression des DAD1 Proteins wurden 1 L LB/Amp mit 10 ml einer Übernachtskultur von pGEXDAD1 inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 wachsen gelassen. Zur Induktion wurden die Bakterien mit einer IPTG-Lösung (Endkonzentration 1 mM) versetzt und für weitere 6 h im Inkubator geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation (4000xg, 20 min) pelletiert und in 200 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 Volumen einer 10 mg/ml Lysozymlösung in 25 mM Tris/HCl, pH 8 wurden die Zellen 8 mal für je 10 sec im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) wurden die Zellen 1 h leicht geschüttelt und nochmals im Ultraschallbad aufgeschlossen. Anschließend wurden die

Zelltrümmer bei 12 000xg, 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose-4B für 3 h im Batch Verfahren bei RT gebunden. Das Harz wurde nach der Bindung in eine Säule überführt und 3 mal mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 ml reduziertem Glutathion (50 mM in 200 mM Tris/HCl pH 8) in 1 ml Fraktionen. Nach Elution des Fusionsproteins wurde der GST-Schwanz durch Zusatz von Thrombin (10 U/mg Protein) abgespalten. Die Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE kontrolliert.

5.6.1.2 Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung der Antikörper

Die Abtrennung des DAD1 von GST erfolgte durch präparative SDS-PAGE nach Schägger & Jagow (1987).

Hierzu wurden 1,5 mg Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min für 100°C erhitzt und dann unterschichtend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront das untere Ende erreicht hatte. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und die DAD1 Bande ausgeschnitten. Das Gelstück wurde dann mit flüssigem Stickstoff klein gemörsert, mit 1 ml PBS und 1 ml kompletten Freund'schen Adjuvans vermischt und im Ultraschallbad homogenisiert. Die Emulsion wurde subkutan an drei Stellen in den Rücken des Kaninchens gespritzt. In Abständen von 3-6 Wochen wurden dem Kaninchen zur Stimulierung der Immunantwort mehrmals 100 µg Protein in Freund'schem Adjuvans (inkomplett) injiziert. Ca. 10 Tage nach Injektion wurde dem Kaninchen Blut aus der Ohrvene entnommen und aus dem 1 h bei Raumtemperatur geronnenen Blut durch Zentrifugation bei 3000xg für 30 min das Serum gewonnen. Der Verlauf wurde durch Immunoblots kontrolliert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert.

5.6.1.3 Herstellung von Antikörpern gegen Peptide

Polyklonale Peptid-Antikörper gegen DAD1 und Ribophorin I wurden von der Firma Pineda-Antikörper-Service hergestellt. Es wurden jeweils 2 verschiedene Peptide nach der Fmos Methode synthetisiert, mittels RP-HPLC gereinigt und mit keyhole limpet haemocyanin gekoppelt. Anschließend wurden pro Peptid zwei Kaninchen immunisiert. Der Verlauf der Immunisierung wurde durch Immunoblots untersucht. Die Antikörper,

die gute Ergebnisse erzielen wurden reinigen gelassen. Der Titer der Antikörper wurde über einen ELISA bestimmt.

5.6.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall 1981)

Der ELISA ist ein Verfahren, das dem Nachweis und der Konzentrationsbestimmung (Titer) von Antikörpern dient.

Lösungen:

Antigenlösung	5 µg Antigen in 50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6 mit 0,02 % NaN_3
Blockierlösung	3 % BSA in PBS-T (PBS, 0,05 % Tween 20)
1. Antikörperlösung	Antikörper in entsprechender Verdünnung in 1 % BSA, PBS-T
2. Antikörperlösung	anti-(Kaninchen)-Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugat in 1 % BSA, PBS-T
Substratlösung	1 mg/ml Nitrophenylphosphat in 50 mM Natriumcarbonat, pH 9,8, 1 mM MgCl_2

In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden 100 µl Antigenlösung üN bei 4°C inkubiert. Nachdem dreimal mit je 200 µl PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Absättigung der freien Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Blockierlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Es wurde mit 100 µl der zu testenden Antikörperlösung (Kaninchen-Antiserum oder affinitätsgereinigter Antikörper in 1:2 Verdünnungen im Bereich von 1:100 bis 1:12800) inkubiert und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Die Entwicklung wurde mit 200 µl Substratlösung gestartet und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lage des Wendepunktes in der gemessenen Antikörpertitrationskurve ist ein Maß für die Antikörperkonzentration (Antikörpertiter = Verdünnung im Wendepunkt der Kurve).

5.6.3 Immunoblotanalyse (Blake 1984; Theisen 1986)

Die Entwicklung des Western Blots erfolgt nach folgendem Schema:

Zunächst erfolgte eine Blockierung noch freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosefolie durch eine zweistündige Inkubation mit einer 3 %igen BSA/PBS, 0,5 % Tween 20 (PBS-T) Lösung (PBS: phosphat buffered saline: 150 mM NaCl, 1 mM Na₂PO₄, pH 7,2). Der enzymespezifische Antikörper bindet 2 h bei RT oder üN bei 4°C an das zu untersuchende Protein. Die Antikörperlösung wird je nach Antikörper 1:500-1:10000 mit 1 % BSA in PBS-T verdünnt. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS-T (jeweils 5-10 min) entfernt. Die Membran wird mit einer 1:10000 Verdünnung (in 1 % BSA/PBS-T) eines Ziege-anti-(Kaninchen)-Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist für zwei Stunden inkubiert, um den auf der Folie gebundenen ersten Antikörper zu markieren. Anschließend wird dreimal für 5-10 min mit PBS-T und einmal mit Färbepuffer 5-Bromo-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (1 mg) und Nitroblau-tetrazoliumchlorid (2 mg) in 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 2 mM MgCl₂ und 150 mM NaCl gewaschen.

5.6.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie stellt eine empfindliche Methode zur Lokalisation von Proteinen in Zellen dar. Hierbei wird ein spezifisch primärer Antikörper an ein immobilisiertes Antigen gebunden und anschließend mit einem zweiten Antikörper, der an die konstante Region des ersten IgG's bindet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff (DTAF oder Rhodamin) konjugiert ist, nachgewiesen. Der fluoreszierende Farbstoff wird im Epifluoreszenzmikroskop durch bestimmte Wellenlängen angeregt und sendet beim Zurückkehren in den Grundzustand sichtbares Licht aus.

Die Methode wurde ausschließlich mit transfizierten COS 1-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden vor Beginn der Transfektion Deckgläschen in Kulturschalen gelegt, so daß die adhärennten Zellen auch auf diesen wachsen konnten.

18-48 h post Transfektion wurden die Deckgläser entnommen und nach folgendem Protokoll fixiert, ggf. permeabilisiert und detektiert:

Waschen	3x 5 min mit PBS
Fixieren	1 h mit 8 % Formaldehyd
Waschen	2x 5 min mit 200 mM Hepes, pH 7,2
Permeabilisieren (ggf.)	1x 5 min mit 0,2 % Triton-X-100, 200 mM Hepes, pH 7,2
Waschen	3x 5 min mit 200 mM Hepes, pH 7,2

Blockieren	mit 3 % Ovalbumin, PBS
Waschen	3x 5 min mit 0,1 % Ovalbumin, PBS
1. Antikörperlösung	1. Antikörper in entsprechender Verdünnung in 0,1 % Ovalbumin, PBS 90 min bei 37 °C inkubieren
Waschen	6x 5 min mit 0,1 % Ovalbumin
2. Antikörperlösung	Antikörper 1:100 in 0,1 % Ovalbumin, PBS, 1 h bei 37 °C inkubieren
Waschen	3x 5 min mit PBS 3x 5 min mit Aqua dest.

Die gewaschenen Deckgläschen wurden mit 40 µl Mowiol, 50 mg/ml DABCO eingebettet und für 15 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden sie im Epifluoreszenzmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv betrachtet.

5.7 Molekularbiologische Methoden (Sambrook et al. 1989)

5.7.1 Lösungen und Medien

LB++:	10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl auf 1 l Aqua dest. auffüllen, autoklavieren bei 120°C, 1,6 bar Innendruck für 30 min; Zugabe von je 1/100 Volumen 20 % Maltose und 1 M MgSO ₄
LB-Platten:	10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 10 g Agar auf 1 l Aqua dest. auffüllen, autoklavieren wie oben
LB/Amp:	10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren; Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin aus Stocklösung (50 mg/ml)
AB ₃ -Platten:	10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar in 1 l Millipore-Wasser gelöst, wie oben autoklavieren. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurden 50 mg Ampicillin (1 ml einer 50 mg/ml Lösung), 40 mg X-Gal (2 ml einer 20 mg/ml Lösung in DMF) und 48 mg IPTG (2 ml einer 24 mg/ml Lösung dazugegeben.
Top-Agarose:	10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 7 g Agarose auf 1 l Aqua dest. auffüllen, autoklavieren wie oben. Nach Abkühlen auf ca.

	60°C Zugabe von 1/100 Volumen 20 % Maltose und 1/100 10 mM MgSO_4
Stabilat-Agarose:	Zusammensetzung ähnlich wie Top-Agarose, jedoch ohne Maltose und MgSO_4
Glycerinpuffer:	65 % Glycerin, 0,1 MgSO_4 , 25 mM Tris/HCl, pH 7.0, sterilfiltrieren
SM-Puffer:	0,1 M NaCl, 8 mM MgSO_4 , 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,01 % Gelatine, sterilfiltrieren

5.7.2 Screenen von cDNA-Banken

Zur Isolierung eines DAD1-spezifischen Klon wurde die Uni- λ ZAP-cDNA-Bank der Firma Stratagene eingesetzt. Diese cDNA-Bank ist oligo dT geprimt. cDNA-Banken enthalten komplementäre Kopien der Poly-A-mRNA, die über anligierte Linker in den λ -Vektor einkloniert sind. Das Screenen der λ -ZAP-Bank erfolgte nach dem Manual der Firma Stratagene. Zum Screenen wurde der Bakterienstamm *E. coli* MRF' verwendet.

5.7.3 Umklonierung und Analyse rekombinanter Bakterien

5.7.3.1 Auffüllreaktion und Restriktionsverdau

cDNA, die aus Phagenklonen oder durch PCR gewonnen wurde, konnte durch die Generierung kompatibler Enden in Plasmide einkloniert werden. Einerseits wurden hierzu Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die an den Enden der Fragmente liegen, ausgenutzt (EcoRI-Stellen oder künstliche Schnittstellen in Primern der PCR-Produkte) oder solche, die innerhalb der Insert-Sequenz liegen.

Andererseits wurden mittels des Klenow-Fragmentes (Polymerase, der die 5'-3'-exonucleotische Funktion fehlt) Fragmente, die keine günstigen Schnittstellen aufwiesen, aufgefüllt und in ebenfalls stumpfe Enden („blunt-ends“) des Vektors einligiert.

Restriktionsverdau

Gereinigte DNA wurde auf eine Konzentration von nicht über 2 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ Verdau eingestellt. 10x Puffer und die Serumalbuminkonzentration wurden für jedes Enzym ausgewählt. Der Verdau wurde bei der angegebenen Temperatur für 2-20 h inkubiert. Die

geschnittene DNA wurde wie in Kap. 5.7.3.3 beschrieben aus einem 1-2 %igen Agarosegel isoliert.

Auffüllreaktion

x µl DNA

y µl „nick translation“ Puffer (1/10 Volumen)

1 µl Klenow (3 U)

bis zu 25 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 1 h bei 25°C inkubiert und 10 min bei 70°C inaktiviert. Größere Volumina mußten gefällt werden, um die Ligationsansätze nicht zu groß werden zu lassen. Aufgefüllte DNA konnte direkt in eine Ligation eingesetzt werden.

5.7.3.2 Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE	121 g Tris-Base (2 M), 57,1 ml Eisessig (11,4 %), 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (0,1 M) in 500 ml Aqua dest. gelöst, der Puffer wurde 1:5 verdünnt eingesetzt
Probenpuffer	20 % Ficoll, 0,06 M EDTA, pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin
Ethidiumbromid-stammlösung	10 mg/ml in Wasser

Die Agarosekonzentration (1-2 %) richtet sich nach den zu erwartenden Fragmentgrößen. Zur Anfärbung der geelektrisch getrennten DNA-Proben diente der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nucleinsäuren und nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 300-366 nm erscheint der Ethidiumbromid-Nucleinsäure Komplex im sichtbaren Bereich als orange leuchtende Bande. DNA-Proben wurden mit 1/5 ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei max. 100 V, 1x TAE solange durchgeführt, bis die Farbstoffmarker die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatten.

5.7.3.3 Agarosegeleextraktion

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem Geleextraktions-Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Hierbei wird zunächst die zu isolierende DNA ausgeschnitten und die Agarose durch chaotrope Salze (Natriumiodid) aufgelöst. Anschließend wird die DNA an eine Silica-matrix unter Hochsalzbedingungen gebunden und dann bei Niedrigsalzbedingungen eluiert.

5.7.3.4 DNA-Transfer nach Southern (Southern 1975)

Beim Southern Blot werden DNA-Fragmente nach gelelektrischer Auftrennung auf einen Filter transferiert, fixiert und hybridisiert. Hierzu wurde das Agarosegel luftblasenfrei mit einer Membran und einer ca. 10 cm dicken Schicht von Zellstofftüchern bedeckt. Der Transfer erfolgte in 4-10 h mittels Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1 M NaCl). Anschließend wurde die Membran in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0) geschwenkt, getrocknet und dann 2 h bei 80°C fixiert.

5.7.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen dem kinasierten 5'- und dem freien 3' OH-Ende doppelsträngiger DNA-Fragmente, wie sie nach einem Restriktionsverdau entstehen. Für die Ligation werden je nach Art der DNA-Enden folgende Mengenverhältnisse eingesetzt:

„blunt-end“: Plasmid : Insert	1:10 (molar)
„sticky-end“: Plasmid : Insert	1: 5 (molar)

Vor der Ligation wurden die Vektor-DNA sowie das zu inserierende DNA-Fragment enzymatisch gespalten und anschließend nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. Plasmid-Vektoren, die an beiden Enden die gleichen Schnittstellensequenzen besaßen, wurden mit Kalbs-Phosphatasen dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern.

Dephosphorylierung mit „calf intestinal phosphatase“ (CIP)

Die Plasmid-DNA wurde nach Restriktionsverdau ohne vorherige Gelreinigung mit CIP behandelt, wenn der Verdaupuffer entweder der gleiche, wie der der Phosphatase war oder sich durch Zugabe von 10x-Lösungen auf die gleichen Salzverhältnisse umstellen ließ. Hierzu wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

x µl	DNA in Verdaupuffer
y µl	NEB-Puffer 3 oder entsprechende 10x-Lösungen
<u>z µl</u>	<u>CIP (1,5 U/pmol DNA-Enden)</u>
20 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Phosphatase durch Zugabe von 5 mM EDTA und 10 minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Anschließend wurde das Plasmid durch Gelextraktion gereinigt.

Die hier beschriebene Ligation wurde unter Verwendung des „rapid-ligation kit“ der Firma Roche durchgeführt, die Zusammensetzung der Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

Ligation:

Die zu ligierenden Fragmente wurden wie folgt zusammengegeben:

x µl	Plasmid (max. 20 ng)
y µl	Insert
2 µl	5x DNA-Verdünnungspuffer
10 µl	Ligationspuffer
<u>1 µl</u>	<u>Ligase</u>
21 µl	Gesamtvolumen

Die Ligation wurde 15-30 min bei RT durchgeführt und die DNA dann direkt in eine Transformation eingesetzt.

5.7.3.6 Herstellung und Transfektion kompetenter Zellen

Bakterien wurden nach der CaCl₂-Methode transformiert, bei der Komplexe aus DNA und CaCl₂ von den Bakterien während einer „heat-shock“-Phase durch die permeabel

gemachte Zellwand aufgenommen werden. Für die Transformationen wurde der Stamm *E. coli* DH5 α benutzt.

Lösungen:

- TFB I: 30 mM Kaliumacetat, pH 7,2, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂,
15 % Glycerin
- TFB II: 10 mM MOPS, pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden zweimal 25 ml LB-Medium mit 250 μ l einer Übernachtskultur der *E. coli* DH5 α inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2000xg pelletiert. Jedes Pellet wurde in 7,5 ml TFB I resuspendiert und dann erneut bei 3000xg zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in je 1,1 ml TFB II resuspendiert und in 220 μ l Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Testtransformation (1 ng Plasmid, davon 1/10 ausplattiert) wurde durchgeführt, die üblicherweise zu Transformationssequenzen von 10⁶ Kolonien/ μ g DNA führte.

Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (s. 5.7.3.5) bzw. 1/10 Volumen der zu transformierenden DNA gemischt. Die Bakterien wurden 30 min bei 4°C inkubiert und dann 2 min bei 42°C erhitzt („heat-shock“). Nach Abkühlen der Bakterien bei 4°C für 3 min wurde mit LB auf 500 μ l aufgefüllt und die Bakterien 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Von dieser Suspension wurden 100 μ l auf eine AB₃-Platte punktiert und zum anderen in 2 ml LB/Amp angeimpft. Nach 6-12 h wurden die Kulturen aufgearbeitet und die so erhaltene DNA per Restriktionsverdau und/oder PCR auf ihr Rekombinanz überprüft.

5.7.3.7 Reinigung von Plasmid-DNA

Lösungen:

- Resuspendierungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 μ g Rnase A
- Lysispuffer: 0,2 M NaOH, 1 % SDS
- Neutralisationspuffer: 2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8

Je nach Verwendungszweck wurden die Plasmide unterschiedlich gereinigt. Für Anwendungen, die keine hohen Anforderungen an die Reinheit stellen (z.B. Kontrollverdaus) wurde die DNA nach Lyse mit 2 Volumenanteilen 100 %igem Ethanol gefällt, für Anwendungen (z.B. Sequenzierungen, Transfektionen) wurden Anionenaustauschersäulen des DNA-Aufreinigungssystems der Firma Macherey-Nagel verwendet.

1,5 ml bzw. 150 ml Kulturen wurden zunächst durch Zentrifugation bei 10 000xg für 3 min bzw. bei 3000xg für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl bzw. 4 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen, dann mit 200 µl bzw. 4 ml Lysispuffer versetzt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl bzw. 4 ml Neutralisationspuffer zugegeben und anschließend 10 min bei 13 000xg bzw. 3500xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und entweder mit Ethanol gefällt oder über Säulen nach Angabe des Herstellers gereinigt.

5.7.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Sakai et al. 1988; White 1993)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es *in vitro*, unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer, bestimmte Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen.

Folgendes Pipettierschema zeigt die typische Zusammensetzung einer PCR-Reaktion für ein Volumen von 50 µl:

50-200 ng	Template
5 µl	10x PCR-Puffer
2,5 µl	dNTP-Mix (2mM)
1,5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	„sense“-Primer
<u>0,5 µl</u>	<u>„antisense“-Primer</u>
ad 49,5 µl	Milipore Wasser
0,5 µl	Taq-Polymerase

Zur Durchführung der Reaktion wurden die Proben in einen programmierbaren Thermocycler überführt und folgendes Programm gestartet:

<u>Schritt</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Zeit (min)</u>
1	Denaturierung	95	3-5
2	Denaturierung	95	0,5-1
3	Primer-Hybridisierung	$T_M - 5$	0,5-1
4	Polymerisation	72	0,5-1
Wiederholung der Schritte 2-4: 25-35 mal			
5	Polymerisation	72	5-10

Die Hybridisierungstemperatur wurde annäherungsweise aus der Basenzusammensetzung der Oligonukleotidprimer nach der Formel $T_M = 4^\circ\text{C} \times (G + C) + 2^\circ\text{C} \times (A + T)$ ermittelt. Nach Beendigung des Programms wurden die Produkte gelelektrophoretisch analysiert.

5.7.3.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al. 1979) unter Verwendung des *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Applied Biosystems, bei welchem fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide zur DNA-Identifizierung benutzt werden. Zur Sequenzierung wurden zunächst folgende Komponenten zusammengegeben:

- 1 µg DNA
- 5 pmol Sequenzierprimer
- 2 µl Big Dye-Mix (enthält fluoreszierende dNTP's)
- 6 µl Sample Buffer (200 mM Tris, pH 9,0, 5 mM MgCl₂)
- 1 µl DMSO
- ad 20 µl mit Wasser auffüllen

Der Ansatz wurde 2 min denaturiert und das Primeranealling in 25-30 Zyklen (10 s 96°C, 5 s 60°C und 4 min 60°C) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für die automatische Auswertung wie folgt aufbereitet: Zu den 20 µl Reaktionsansatz wurden 50 µl Ethanol (100 %) und 2 µl 3 M NaAc, pH 5,2 zugegeben. Die DNA wurde 10 min auf Eis belassen und dann bei 14 000xg für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde dann mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde 5 min im Vakuum getrocknet, in 5 µl Wasser angelöst, mit 20 µl TSR (Template

Suppression-Reagent, Firma Applied Biosystems) versetzt und mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt.

5.7.4 Analyse von mRNA

Da RNA sehr empfindlich gegen RNasen ist, die so stabil sind, daß sie nur durch extreme Maßnahmen inaktiviert werden können, wurden alle benötigten Materialien (Spatel, Bechergläser, Rührfische) vor Gebrauch mindestens 6 h bei 200°C sterilisiert. Für alle Lösungen, die nicht selber mit DEPC angesetzt werden konnten (z.B. Tris) wurde DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat üN gerührt und durch Autoklavieren inaktiviert) benutzt. Plastikmaterialien sowie die Elektrophoreseapparatur für die Analyse von Transkriptionsprodukten wurden mit 5 % H₂O₂ gewaschen.

5.7.4.1 Reinigung von mRNA

Lösungen:

GTC-Extraktionspuffer:	4 M Guanidiniumthiocyanat, 20 mM NaAc, pH 5,7, 100 mM DTT, 0,5 % Natriumlaurylsarcosine, pH 5,5
CsCl-Lösung:	5,7 M CsCl
Beladungspuffer:	1 M NaCl, 0,5 % SDS, 2x TE, pH 7,5
Bindungspuffer:	0,5 M NaCl, 0,5 % SDS, 2x TE, pH 7,5
Waschpuffer:	0,1 M NaCl, 1x TE, pH 7,5
Elutionspuffer:	TE, pH 7,5
TE:	10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
TES:	10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5, 0,1 % SDS

Reinigung der Gesamt-RNA:

5 g frische Schweineleber wurden mit 90 ml GTC-Extraktionspuffer versetzt und durch dreimaliges Pottern im eisgekühlten Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 4000xg, 13°C zentrifugiert, um Gewebe- und Blutreste zu pelletieren. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch eine 18 gauche Nadel geschert. Polyallomerröhrchen wurden mit 19 ml CsCl-Lösung beschichtet und dann vorsichtig mit je 18 ml des Homogenats überschichtet. Anschlie-

ßend wurde die Lösung 24 h bei 125 000xg, 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet mit 1 ml DEPC-Wasser gewaschen. Die Pellets wurden in 0,5 ml TES-Puffer gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Durch Zugabe von 50 µl 3 M NaAc und 1 ml 100 %igem Ethanol wurde die RNA gefällt und mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Die Gesamt-RNA konnte trocken oder unter Ethanol gelagert werden.

Reinigung der PolyA-mRNA:

1-2 mg trockene Gesamt-RNA wurden in 200 µl 0,5 % SDS resuspendiert, mit 200 µl Beladungspuffer versetzt und 10 min bei 65°C denaturiert. 1 ml oligo-dT-Suspension wurde dreimal mit je 800 µl Bindungspuffer äquilibriert und die resuspendierte RNA dazugegeben. Die Bindung erfolgte 30 min bei RT. Das Harz wurde durch Zentrifugation (5000xg, 4°C, 30 min) pelletiert und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die PolyA-RNA wurde dreimal mit je 300 µl Elutionspuffer bei RT eluiert. Das Eluat wurde nochmals an das oligo-dT-Harz gebunden. Das Harz wurde mit dem Bindungspuffer der ersten Reinigung gewaschen. 900 µl RNA wurden mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 5 % SDS auf die Salzverhältnisse des Bindungspuffer eingestellt und wie bei der ersten Reinigung weiter gereinigt. Die RNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 4,8 und zwei Volumen Ethanol gefällt und unter Ethanol bei -70°C gelagert. Eine Ausbeute von 40-80 µg PolyA-RNA war üblich.

5.7.4.2 Erststrang-Synthese

Lösungen:

Erststrangpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 8,3, 0,75 M KCl, 0,1 M MgCl ₂ , 5 mM Spermidin
dNTP-Mischung	10 mM in Wasser

Mit Hilfe der reversen Transkriptase der Retroviren kann aus mRNA eine komplementäre DNA, die cDNA, synthetisiert werden. Hier wurde das Enzym aus MMVL (molony mouse leukemia virus) benutzt. Für die Synthese des Erststranges wurde folgender Ansatz verwendet:

x µl	oligo-dT-gereinigte mRNA (ca. 1 µg)
y µl	oligo-dT ₁₅ Primer (200 pmol)

<u>z μl</u>	<u>Wasser</u>
12 μ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 5 min auf 70°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren, dann schnell auf 4°C abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

6 μ l	Erststrangpuffer
3 μ l	DTT (10 mM)
1 μ l	RNasin (40 U)
3 μ l	dNTP-Mischung (10 mM)
<u>5 μl</u>	<u>MMVL Reverse Transkriptase</u>
30 μ l	Gesamtvolumen

Die Erststrangsynthese erfolgte erst 90 min bei 4°C, dann 30 min bei 52°C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C für 10 min beendet. Der Erststrang konnte bei -20°C gelagert werden.

5.7.5 Transfektion und Analyse von COS1-Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode (Ausubel et al. 1987)

Lösungen:

DMEM-Medium:	käufliches DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, Penicillin (100 U/min) und Streptavidin (100 μ g/ml) supplementiert
PBS:	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 16 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,7
Trypsin:	0,05 % Trypsin, 5 mM EDTA in PBS

Die Transfektion von COS 1-Zellen erfolgte nach der DEAE-Dextran Methode, bei der Plasmid-DNA mit Hilfe des Dextrans an die Zellwände adsorbiert und dann durch Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. Für eine effiziente Transfektion wird ein DMSO-Schock durchgeführt, der vermutlich den Eintritt der DNA in den Kern erleichtert. Durch Zugabe von Chloroquin, das den pH-Wert der zellulären Vesikel erhöht, wird der Abbau der aufgenommenen DNA reduziert.

Verdünnung

18-24 h vor der Transfektion wurden COS 1-Zellen so verdünnt, daß zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 50-60 % Konfluenz vorlagen. Hierzu wurde eine dicht bewachsene Petrischale zweimal mit je 6 ml PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin-Lösung überschichtet und so lange (ca. 20 min) bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich lösten. Dann wurden 10 ml DMEM-Medium dazugegeben und die Zellen durch sanftes Auf- und abpipettieren dispergiert. Je 2 ml der dispergierten Zellen wurden in eine Petrischale mit 8 ml frischen Medium überführt.

Herstellung von Stabilaten

Die Zellen einer fast konfluenten Schale wurden durch Zugabe von Trypsin gelöst und bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 5 ml DMEM gewaschen, in 2 ml DMEM:DMSO 1:1 aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden langsam eingefroren, d.h. erst 24 h bei -70°C und dann in flüssigem N₂ gelagert.

Transiente Transfektion von COS1-Zellen

Zur Transfektion wurden zunächst folgende Komponenten zusammengegeben:

2 ml PBS

10 µg DNA

107 µl DEAE-Dextran (10 mg/ml)

Die zu transfizierenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Transfektionscocktail überschichtet. Die Anheftung und Aufnahme der DNA wurde bei 37°C im CO₂-Inkubator durchgeführt, wobei die Schalen alle ab und zu geschwenkt wurden, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Sobald die Zellen unter dem Mikroskop ein abgerundetes, stark-leuchtendes Aussehen angenommen hatten, wurde die Inkubation durch Zugabe von 10 ml DMEM-Medium beendet. Nach Zugabe von 24 µl Chloroquin (40 mM in PBS) wurden die Schalen für 2 h im CO₂-Inkubator belassen und dann 2,5 min mit 2 ml 10 % DMSO in Kulturmedium inkubiert. Danach wurde die DMSO-Lösung gründlich entfernt und die Zellen in 10 ml Kulturmedium bis zur Ernte inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium nochmals gewechselt.

Ernte und Lyse von COS 1-Zellen

48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst dreimal mit 6 ml Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,2 137 mM NaCl, 3 mM KCl) gewaschen und dann mit einem Gummiwischer (rubber policeman) in 1 ml Waschpuffer von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C, 4000 rpm für 10 min pelletiert und das Pellet in Lysispuffer (vom jeweiligen Experiment abhängig) aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert.

5.7.6 *In vitro* Transkription/Translation

5.7.6.1 Radioaktive Transkription/Translation

Die radioaktive Transkription/Translation erfolgte unter Verwendung des Systems der Firma Promega unter RNase-freien Bedingungen auf Eis. Dabei wurden 1 µg cDNA und 40 µl des TNT-Quick-Master-Mix in Gegenwart des [³⁵S]Methionin (2 µl) in einem Schritt nach Anleitung des Herstellers zusammenpipettiert und anschließend 1,5 h bei 30°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

5.7.6.2 Gekoppelte Transkription/Translation mit dem RTS-System der Fa. Roche

Das RTS-System (RTS100 *E. coli* HYKH) der Firma Roche stellt ein zellfreies Protein Expressionssystem dar, das sich die hohe Transkriptionsrate des T7-RNA-Polymerase/-Promoter-Systems zunutze macht, um große Mengen proteinspezifischer mRNA zu erzeugen. Das RTS-System kann entweder mit einem entsprechend aufgebauten Plasmid oder mit einem linearen PCR-Produkt programmiert werden.

Erzeugung eines linearen PCR-Produktes zur Programmierung des RTS-Systems

Lineare DNA-Fragmente für die *in vitro* Protein-Expression wurden mittels des „Rapid Translation Systems RTS *E. coli* Linear Template generation Sets“ der Firma Roche erzeugt. Hierbei wird über 2 PCR Reaktionen lineare DNA hergestellt, die sofort für RTS100 Reaktionen eingesetzt werden kann. In der 1. genspezifischen PCR Reaktion werden zum einen definierte überlappende Regionen an die gewünschten Gen-Sequen-

zen angehängt. Zum anderen werden Mutationen in die cDNA-Sequenz eingeführt, die jedoch nicht zu Aminosäureaustauschen führen. Durch den Austausch von 8 Nukleotiden innerhalb der ersten 6 Kodons ist es möglich die Expressionsausbeuten zu erhöhen. Dabei wurden 10 Primer mit verschiedenen Mutationen und der Wildtyp eingesetzt.

1. PCR-Reaktion:

5 µl	10x PCR-Puffer
6 µl	MgSO ₄ (25 mM)
1 µl	Primer sense (5-15 mM)
1 µl	Primer antisense (5-15 mM)
6,25 µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM)
1,2 µl	Pwo-Polymerase (3 U)
<u>1 µl</u>	<u>Template (1-500 ng)</u>
ad 50 µl mit Wasser auffüllen	

Anschließend wurden die PCR-Produkte einer 2. PCR unterzogen, in der über Primer regulatorische Sequenzen, Promoter- und Terminatorregionen sowie ein His₆-Tag eingeführt wurden.

2. PCR-Reaktion:

5 µl	10x PCR-Puffer
6 µl	MgSO ₄ (25 mM)
6,25 µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM)
4 µl	T7-Promoter Primer
4 µl	T7-Terminator Primer
1 µl	His-Tag/C-Terminal
3 µl	PCR-Produkt aus 1. PCR
<u>1,2 µl</u>	<u>Pwo-Polymerase (3 U)</u>
ad 50 µl mit Wasser auffüllen	

Das 2. PCR Produkt kann direkt ohne vorherige Reinigung für RTS100-Reaktionen eingesetzt werden.

Expression von Proteinen im RTS100 System

Zur Expression der Proteine wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

12 µl	<i>E.coli</i> Lysat
10 µl	Reaktionsmix
12 µl	Aminosäuremix
1 µl	Methionin
5 µl	Rekonstitutionspuffer
0,5 µg	lineares PCR Produkt bzw. Plasmid

Die Ansätze wurden für 6 h bei 30°C inkubiert, anschließend wurde ein Aliquot entnommen und über SDS-PAGE analysiert.

6 Literatur

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York
- Bartoschek, A. (2001), Dissertation Bonn
- Bause, E. & Legler, G. (1981) *Biochem. J.* **195**, 639-644
- Bause, E. (1979) *FEBS Lett.* **103**, 296-299
- Bause, E. (1983) *Biochem. J.* **209**, 331-336
- Bause, E., Wesemann, M., Bartoschek, A. & Breuer, W. (1997) *Biochem. J.* **322**, 95-102
- Blake, D. (1984) *Anal.Biochem.* **136**, 175-179
- Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279-285
- Breuer, W. & Bause, E. (1995) *Eur.J.Biochem.* **228**, 689-696
- Chalifour, R.J. & Spiro, R.G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15673-15680
- Durand, G., Seta, N. (2000) *Clin. Chem.* **46**, 795-805
- Engvall, E. (1980) *Methods in Enzymology* **Vol 70**, 419-439
- Fu, J. & Kreibich, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3984-3990
- Hardt, B. (2001) Dissertation Bonn
- Hardt, B., Aparicio, R. & Bause, E. (2001) *Biol. Chem.* **382**, 1039-1047
- Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory Press, USA
- Hart, G., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. & Kelly, W.G. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 841-874
- Imperiali, B. Shannon, K.L. & Rickert, K.W. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7942-7944
- Imperiali, B., Shannon, K.L., Unno, M. & Rickert, K.W. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7944-7945
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Glimore, R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272(51)** 32513-32520

- Kelleher, D.J. & Gilmore, R. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4994-4999
- Kelleher, D.J., Kreibich, G. & Gilmore, R. (1992) Cell **69**, 55-65
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) Annu. Rev. Biochem. **54**, 631-664
- Kozak, M. (1996) Mamm. Genome **7**, 563-574
- Kumar, V. Heinemann, F.S. & Ozols, J. (1995) Biochem. Mol. Biol. Int. **36**, 817-826
- Kumar, V., Heinemann, F.S. & Ozols, J. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 13451-13457
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. **152**, 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Nature **227**, 680-685
- Makishima, T., Nakashima, T., Nagata-Kuno, K., Fukushima, K., Lida, H., Sakaguchi, M., Ikehara, Y., Komiyama, S. & Nishimoto, T. (1997) Genes Cell **2**, 129-141
- Marshall, R.D. (1972) Ann. Rev. Biochem. **41**, 673-702
- Nakashima, T., Sekigushi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S. & Nishimoto, T. (1993) Mol. Cell Biol. **13**, 6367-6374
- Rogl, H., Kosemund, W., Kuhlbrandt, W., Collinson, I. (1998) FEBS Lett. **432(1-2)**, 21-6
- Ronin, C, Bouchilloux, S., Granier, C. & van Rietschoten, J. (1978) FEBS Lett. **96**, 179-182
- Sakai, K., Gelfand, D.H., Stoffels, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988) Science **239**, 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 5463-5468
- Sanjay, A., Fu, J. & Kreibich, G. (1998) J. Biochem. **273**, 26094-26099
- Schagger, H., von Jagow, G. (1987) Anal. Biochem. **166**, 368-379
- Schutze, M.P., Peterson, P.A. & Jackson, M.R. (1994) EMBO J. **13**, 1696-1705
- Shaw, E., Mares-Guia, M. & Cohen, W. (1965) Biochemistry **4**, 2219-2224
- Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. **98**, 503-511
- Teasdale, R.D., Jackson, M.R., (1996) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **12**, 27-54

- Theisen, N. (1986) *Anal. Biochem.* **152**, 211-214
- Towbin, C. (1979) *Proc. Natl. Acad.Sci.* **76**, 4350-4354
- Trembl, K., Meimaroglou, D., Hentges, A. & Bause, E. (2000) *Glycobiol.*, **10**, 493-502
- Wacker, M, Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M, Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., Aeby, M. (2002) *Science* **29**, 298(5599):1790-1793
- Wang, C.S. & Smith, R.L. (1975) *Anal. Biochem.* **63**, 414-419
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984) *Anal. Biochem.* **138**, 141-143
- White, B.A. (1993) *PCR-Protocols-Current Methods and Applications*. Humana Press, Ottawa
- Yan, Q., Lennarz, W.J. (2002) *J. Biol. Chem.* **49**, 47692-47700
- Yoshida, S., Ohya, Y. Nakano, A. Auraku, Y. (1995) *Gene* **164**, 167-172
- Zhou, Y., Singh, B.R. (2004) *Protein Expr Purif* **84(1)**, 8-16

7 Anhang

7.1 Primer

7.1.1 DAD1

Sondenherstellung Mensch

DH1s ATG GAA TTC ATG TCG GCG TCG GTA GTG TCT
 DH1as TGA CGC TCG AGT CAG CCA ACA AAG TTC AT

Sequenzierprimer sense

D2s AGC AGA TTT CCA AGG CAT CTC
 D3s GCT TCT GAC TCA GAA TAA CT

Sequenzierprimer antisense

D2a AAG AGT TGA AGG GGA AGG TCC

Primer für die Einführung der myc-tag Sequenzen

C-terminal

D1sEcoRI CCG GAA TTC ATG TCG GCG TCG GTG TTG TCG GTA ATC TCC
 CGG
 D1aNotI CGG CCG CGG CCG CTC AGC CAA CAA AGT TCA TGA CAA CGA
 GGT G

Primer für die Einführung in den Vektor pSVSport-GFP

GFPD1EagI ATG CGG CCG ATG TCG GCG TCG GTG TT
 GFPD1HindIII CCC AAG CTT TCA GCC AAC AAA GTT CTA

7.1.2 OST48

Primer für die Einführung in den Vektor pIVEX-2.3MCS

2.3048NdeIs GGA ATT CCA TAT GAG CGG TCC CGT ACC TTA
 2.3048SalIas ACG CGT CGA CCG TCA GAC TTC TCC TTC TC

Primer zur Kodonoptimierung

OST48/1 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT CAG GTC CTC GTA CAT
 TAG TGC TTC TGG AC

OST48/2	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CAG</u> GTC <u>CTC</u> GTA <u>CAT</u> TGG TGC TTC TGG ACA AC
OST48/3	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CAG</u> GTC <u>CTC</u> GTA <u>CTC</u> TTG TGC TTC TGG ACA AC
OST48/4	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GCG GTC <u>CTC</u> GTA <u>CAT</u> TAG TGC TTC TGG AC
OST48/5	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CAG</u> GTC <u>CAC</u> GTA <u>CAT</u> TAG TGC TTC TGG AC
OST48/6	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CTG</u> GTC <u>CTC</u> GTA <u>CAT</u> TAG TGC TTC TGG AC
OST48/7	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA <u>GTG</u> GTC <u>CTC</u> GTA <u>CAT</u> TAG TGC TTC TGG AC
OST48/8	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT CGG GTC CTC GTA CAT TAG TGC TTC TGG AC
OST48/9	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CAG</u> GTC <u>CTC</u> GTA <u>CAC</u> TTG TGC TTC TGG ACA AC
OST48/10	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT <u>CAG</u> GTC <u>CAC</u> GTA <u>CTT</u> TGG TGC TTC TGG ACA AC
OST48/11 (WT)	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GCG GTC CCC GT
Mutierte Basen sind unterstrichen; WT = Wildtyp	
OST48/as	TGA TGA TGA GAA CCC CCC CCG TCA GAC TTC TCC TTC

7.1.3 Ribophorin I

Primer für Einführung in den Vektor pIVEX-2.3MCS

2.3RINdeI	GGA ATT CCA TAT GTC CCC CGA GGC GCT GCC G
2.3SalIas	CGC GTC GAC CCA GTG CAT CCA AGA TGT G

Primer zur Kodonoptimierung

RI/1	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA <u>GTC</u> <u>CAG</u> <u>AAG</u> <u>CAT</u> <u>TAC</u> CAC TGG TCA ACG AGG A
RI/2	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA <u>GTC</u> <u>CTG</u> <u>AAG</u> <u>CAT</u> <u>TAC</u> <u>CAC</u> TGG TCA ACG AGG A

RI/3 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GCC CTG AAG CAT TAC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/4 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GTC CCG AAG CAT TAC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/5 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GCC CAG AAG CAT TAC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/6 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GCC CCG AAG CAT TAC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/7 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GTC CAG AAG CAT TAC CGC
 TGG TCA ACG

RI/8 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GTC CTG AAG CAT TAC CTC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/9 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA GTC CAG AAG CAT TGC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/10 CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT CAC CAG AAG CAT TAC CAC
 TGG TCA ACG AGG A

RI/11(WT) CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT CCC CCC AGG CG

Mutierte Basen sind unterstrichen; WT = Wildtyp

RIas TGA TGA TGA GAA CCC CCC CCC AGT GCA TCC AAG AT

7.1.4 STT3

Sequenzierprimer STT3 sense

STT-1s CAG CTG ATC GTC GTG TGT TGC CAC

STT-2s ATG ACTA AG TTT GGA TTT TTG CG

Sequenzierprimer STT3 antisense

STT-1a GCT CAG TGC GAA GCA TAT CAG AGC

STT-2a TTA TGT CCT TGA CAA GCC TCG

Primer für Einführung in den Vektor pcDNA3

STT3EcoRI CCG GAA TTC ATG ACT AAG TTT GGA TTT TTG CGA

STT3NotI CGG CCG CGG CCG CTT ATG TCC TTG ACA AGC CTC

7.2 Herstellung der Vektorkonstrukte

pSV-DAD1

Der Klon IDAD1 wurde mit EcoRI geschnitten und das DAD1-Fragment in den mit EcoRI verdauten Vektor pcDNA3 ligiert.

pcDAD1

Das Vektorkonstrukt pSV-DAD1 wurde mit EcoRI verdaut und DAD1-Fragment in den mit EcoRI verdauten Vektor pcDNA3 ligiert.

pcDAD1N-myc

Das PCR-Fragment (Template pcDAD1; Primer D1sEcoRI/myc/D1aNotI) wurde mit EcoRI/NotI verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3 kloniert.

pcDAD1C-myc

Das PCR-Fragment (Template pcDAD1; Primer D1sEcoRI/D1aNotImyc) wurde mit EcoRI/NotI verdaut und in den EcoRI/NotI geschnittenen Vektor pcDNA3 einkloniert.

pQE-30DAD1

Das Vektorkonstrukt pSV-DAD1 wurde mit KpnI und HindIII geschnitten und in den mit den entsprechenden Enzymen geschnittenen Vektor pQE-30 kloniert.

pGEXDAD

Das Plasmid pcDAD1 wurde mit EcoRI/NotI geschnitten und in den mit EcoRI/NotI verdauten Vektor pGEX-4T1 kloniert.

pSVSport.1-GFP

GFP wurde aus dem Vektor pGFP-N3 durch Verdau mit KpnI und NotI ausgeschnitten und das GFP-Fragment in den mit KpnI/NotI verdauten Vektor pSVSport.1 kloniert.

pSVSportDAD1-GFP

Ein PCR Produkt (Template pcDNA3; Primer GFPD1EagI/GFPHindIII) wurde mit EagI und HindIII geschnitten und in den Vektor pSVSport.1-GFP kloniert, der ebenfalls mit EagI/HindIII verdaut worden war.

pIV-OST48

Ein PCR-Produkt (Template pCMV-OST48 [s. Dr. Arbeit Hardt 2001]; Primer 2.3O48NdeI bzw. 2.3O48SalI) wurde mit NdeI/SalI geschnitten und das Fragment in das entsprechend geschnittene Plasmid pIVEX-2.3MCS kloniert.

pIV-RI

Ein PCR-Fragment (Template pCMV-RI [s. Dr. Arbeit Hardt 2001]; Primer 2.3RINdeI bzw. 2.3RISalI) wurde mit NdeI und SalI verdaut und in das entsprechend geschnittene Plasmid pIVEX-2.3MCS kloniert.

pcTo-OST48

Die in der 2. PCR-Reaktion (s. Kap. 5.7.6.2) erhaltene cDNA-Variante 1 wurde mittels des „TOPO TA Cloning Kit“ der Fa. Invitrogen nach Angaben des Herstellers in den Vektor pcRIITOPO-Vektor kloniert.

pcTo-RI

Die in der 2. PCR-Reaktion (s. Kap. 5.7.6.2) erhaltene cDNA-Variante 2 wurde mittels des „TOPO TA Cloning Kit“ der Fa. Invitrogen nach Angaben des Herstellers in den Vektor pcRIITOPO-Vektor kloniert.

pcSTT3

Ein PCR-Fragment (Primer STT3EcoRI/STT3NotI) wurde mit EcoRI und NotI verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3 kloniert.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung des Dolichol-P-Zyklus.....	2
Abb. 1-2:	Transglykosylierungsreaktion des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharidvorläufers auf einen spezifischen Asparaginrest der wachsenden Polypeptidkette.....	3
Abb. 1-3:	Modell zum Reaktionsmechanismus der Oligosaccharyltransferase:	4
Abb. 2-1:	Zeitabhängige Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe mit Dol-PP- [¹⁴ C]GlcNAc ₂	6
Abb. 2-2:	Einfluß verschiedener Detergenzien auf die OST-Aktivität.....	8
Abb. 2-3:	Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 1,2 % Triton X-100.....	9
Abb. 2-4:	Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 0,1 % Desoxycholat.....	10
Abb. 2-5:	Einfluß verschiedener Phospholipide auf die OST-Aktivität in Anwesenheit von 1 % Octylglucosid.....	10
Abb. 2-6:	pH-Abhängigkeit der OST (Breuer & Bause 1995).....	11
Abb. 2-7:	Struktur von N-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon.....	12
Abb. 2-8:	Konzentrationsabhängige Inaktivierung der OST-Aktivität durch N-Tosyl-L- Lysine-Chlormethylketon.....	12
Abb. 2-9:	Hemm-Messungen mit TLCK bei gleichzeitiger Anwesenheit des Standard-peptids.....	13
Abb. 2-10:	Struktur der photoaktivierbaren Peptide Bz-Asn-Orn(N ₃ NO ₂ Bz)-Thr-NHMe (I), N ₃ NO ₂ Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe (II), Bz-Asn-Lys(N ₃ NO ₂ Bz)-Thr-NHMe (IV) (Bartoschek 2001) sowie des diazidobenzoylierten Peptids N ₃ NO ₂ - Tyr-Asn-Lys(N ₃ NO ₂)-Thr-Ser-Val-NHMe (III).....	14
Abb. 2-11:	Konzentrationsabhängige Glykosylierung von N ₃ NO ₂ Bz-Tyr-Asn- Lys(N ₂ NO ₂ Bz)-Thr-Ser-Val-NHMe	15
Abb. 2-12:	Bestrahlungsexperimente mit Standardrezeptorpeptid, photoaktivierbaren Peptiden und Nitrobenzoesäure.....	16
Abb. 2-13:	Nukleotid- und Aminosäuresequenz von DAD1 aus Schweineherzmuskel	18
Abb. 2-14:	Hydrophobizitätsanalyse von DAD1 nach Kyte & Doolittle (1982)	19
Abb. 2-15:	SDS-PAGE der Zellsuspensionen vor und nach Induktion mit IPTG	21

Abb. 2-16:	Sequenzen der synthetisierten Peptide, die zur Antikörpergewinnung benutzt wurden.....	22
Abb. 2-17:	ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration im Kaninchenserum	23
Abb. 2-18:	Immunoblot mit einem gegen den C-terminalen Bereich von DAD1 gerichteten affinitätsgereinigtem Antikörper	24
Abb. 2-19:	Nachweis von DAD1 in Schweinelebermikrosomen.....	24
Abb. 2-20:	Immunoblotanalyse von pSVSport.1DAD1-GFP transfizierten COS 1-Zellen	26
Abb. 2-21:	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von pSVSport.1DAD1-GFP transfizierten COS 1-Zellen.....	27
Abb. 2-22:	Immunoblotanalyse von transfizierten COS 1-Zellen	29
Abb. 2-23:	Messung der Enzymaktivität der Oligosaccharyltransferase von transfizierten COS 1-Zellen.....	30
Abb. 2-24:	Immunoblotanalyse nach Transfektion von COS 1-Zellen mit pcDNA3 und dem Vektorkonstrukt pCMV-OST48-R1-myc.....	32
Abb. 2-25:	Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe in transfizierten COS 1-Zellen	32
Abb. 2-26:	Immunoblotanalyse mit in COS1-Zellen überexprimierten OST-Untereinheiten	34
Abb. 2-27:	Prinzip der Herstellung linearer PCR-Produkte für die in vitro Proteinexpression im RTS100.....	36
Abb. 2-28:	Typische Produkte der 1. PCR-Reaktion nach Einführung verschiedener Mutationen in die Ribophorin I-spezifischen-cDNA.....	37
Abb. 2-29:	Analyse der PCR-Produkte nach Einführung regulatorischer Elemente (2. PCR) an die Ribophorin I-spezifischen Produkte der 1. PCR.....	38
Abb. 2-30:	Immunoblotanalyse mit den im RTS-System synthetisierten OST-Untereinheiten Ribophorin I und OST48 nach (Spuren 1-10) und vor Basenoptimierung (Spur WT)	38
Abb. 2-31:	Translation von OST48 und Ribophorin I im RTS-System.....	40
Abb. 2-32:	Basen- und Aminosäuresequenz von STT3	44
Abb. 2-33:	Hydrophobizitätsanalyse von STT3 nach Kyte & Doolittle (1982).....	45
Abb. 2-34:	Gekoppelte in vitro Translation/Transkription von STT3.....	45
Abb. 2-35:	Glykosylierung von Bz-Asn-Gly-Thr-NHMe in Abhängigkeit von der Zeit	46

Ich möchte allen, die mir bei der Erstellung dieser Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, herzlich danken.

Meinem betreuenden Hochschullehrer, Herr. Prof. Dr. E. Bause, gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ohne seine stets gewährte Betreuung wäre die Fertigstellung der Dissertation in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bause für das angenehme Arbeitsklima und nette Stunden auf dem Weihnachtsmarkt. Mein Dank gilt Uschi Gerken, die dafür gesorgt hat, daß immer genug COS 1-Zellen zur Verfügung standen. Bei Ulla Buttkau, die immer für Nachschub gesorgt hat, was Lösungen und so weiter betrifft. Bei Christof Völker und Michaela Hauptmann, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Birgit Hardt, ohne deren Hilfe diese Arbeit in dieser Form nicht hätte entstehen können. Ihr für alles zu danken, was sie für mich getan hat würde diese Seite sprengen, vielen Dank für alles.

Manfred Pflüger danke ich, daß er immer da war, wenn es Ärger mit dem PC gab.

Meinen Eltern, die mir während meines ganzen Studiums durch großzügige finanzielle Unterstützung ein sorgenfreies Leben ermöglicht haben und immer für mich da sind, möchte ich ganz besonders danken.