

Der Oligosaccharyltransferase-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*:

Funktionelle Charakterisierung von Stt3 aus Hefe und seinen Homologen aus *Campylobacter*, *Leishmania* und Mensch

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg



vorgelegt von

Katrin Hese
aus Weiden i. d. Opf.

Regensburg, Februar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 12.02.2008

Tag des Kolloquiums: 18.04.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. L. Lehle

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender:	Prof. Dr. W. Seufert
Erstgutachter:	Prof. Dr. L. Lehle
Zweitgutachter:	Prof. Dr. G. Längst
Drittprüfer:	Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Die eukaryotische N-Glykosylierung	9
1.2 Stt3 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , die am höchsten konservierte Untereinheit des OST-Komplexes	12
1.3 Proteinglykosylierung im pathogenen Eubakterium <i>Campylobacter jejuni</i>	14
1.4 N-Glykosylierung in parasitären Protisten	17
1.5 Stt3-homologe Proteine aus Höheren Eukaryoten.....	19
1.6 Überblick über die charakteristischen Eigenschaften der OST aus unterschiedlichen Organismen.....	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse und Diskussion	24
2.1 Funktionelle Untersuchungen zum Stt3 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1.1 Die C-terminale Domäne von Stt3 enthält konservierte DXD-Motive	24
2.1.2 <i>Calcofluor White</i> und <i>Caffeine</i> zeigen keinen Einfluß auf das Wachstum der DXD-Mutanten.....	26
2.1.3 Die Mutante D508A revertiert den Unterglykosylierungsphänotyp des temperatursensitiven Stammes <i>stt3-7</i>	28
2.1.4 D494A, D582A und D583A führen zu einer reduzierten <i>in vitro</i> Aktivität der Oligosaccharyltransferase.....	29
2.1.5 Die Mutanten D494A, D582A und D583A erzeugen einen letalen Phänotyp.....	30
2.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	32
2.2 Untersuchungen zum Stt3-Homolog PglB aus <i>Campylobacter jejuni</i>	36
2.2.1 Klonierung von <i>PGLB</i> aus NCTC11168	36
2.2.2 PglB kann die Unterglykosylierung des temperatursensitiven Stammes <i>stt3-7</i> nicht revertieren.....	39
2.2.3 Untersuchungen der OST-Aktivität in Abhängigkeit von PglB	41

2.2.4 PglB wird bei Expression in <i>S. cerevisiae</i> an zwei von drei möglichen Stellen glykosyliert	44
2.2.5 Optimierung der Akzeptorsequenz in der C-terminalen Domäne von PglB	48
2.3 Untersuchungen zu Stt3-Homologen aus <i>Leishmania major</i>	52
2.3.1 <i>Leishmania major</i> codiert vier Stt3-Homologe	52
2.3.2 Die drei Stt3-Isoformen <i>L.m.</i> 2191, <i>L.m.</i> 2192 und <i>L.m.</i> 2194 komplementieren den Unterglykosylierungsphänotyp nach Abschaltung von <i>S.c.</i> Stt3 fast vollständig	55
2.3.3 Sporen mit <i>L.m.</i> 2191 und <i>L.m.</i> 2193 sind nicht lebensfähig	59
2.3.4 <i>L.m.</i> 2191 überträgt DolPP-GlcNAc ₂ Man ₆₋₉ <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> mit gleicher Effizienz.....	61
2.3.5 Veränderte Substratspezifität durch außerhalb des OST-Komplexes lokalisiertes <i>L.m.</i> 2191	67
2.4 Untersuchungen zum Stt3-A aus <i>Homo sapiens</i>	71
2.4.1 <i>Homo sapiens</i> codiert für ein hoch konserviertes Stt3-Homolog Stt3-A	71
2.4.2 <i>H.s.</i> Stt3-A kann <i>S.c.</i> Stt3 funktionell nicht ersetzen	73
2.5 Zusammenfassender Überblick über die untersuchten Stt3-Homologe aus <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>L. major</i> und <i>H. sapiens</i>	76
2.6 Funktionelle Untersuchung von Fusionsproteinen zwischen Stt3 aus <i>S. cerevisiae</i> und Homologen von <i>C. jejuni</i> , <i>L. major</i> und <i>H. sapiens</i>	79
2.6.1 Fusionen zwischen <i>S.c.</i> Stt3 und <i>C.j.</i> PglB generieren kein aktives Protein	80
2.6.2 Chimäre aus <i>S.c.</i> Stt3 und <i>L.m.</i> Stt3 sind katalytisch nicht aktiv	82
2.6.3 Domänenauftausche zwischen Stt3 von Hefe und Mensch erzeugen keine funktionellen Proteine	85
2.7 Fusion von <i>S.c.</i> Stt3 und <i>H.s.</i> Stt3-A auf der Suche nach Determinanten für die Inkorporation von Stt3 in den OST-Komplex	87
2.7.1 Sequenzvergleich von <i>H.s.</i> Stt3-A und <i>S.c.</i> Stt3 erlaubt die Festlegung der Transmembranspannen und Konstruktion der Fusionen	87
2.7.2 Funktionelle Untersuchungen der Fusionskonstrukte <i>H.s.</i> (TM ₂):: <i>S.c.</i> (₂ TM) ^{ZZ} und <i>H.s.</i> (TM ₇):: <i>S.c.</i> (₇ TM) ^{ZZ}	90
2.7.3 Untersuchung der Fusionschimäre <i>H.s.</i> Stt3-A:: <i>S.c.</i> Stt3 auf Integration in den OST-Komplex	92
2.7.4 Mutationsanalysen des ersten luminalen <i>Loops</i> von <i>H.s.</i> (TM ₂):: <i>S.c.</i> (₂ TM) ^{ZZ}	94

2.8 Versuche zur Generierung einer enzymatisch aktiven Oligosaccharyltransferase aus <i>S. cerevisiae</i>	96
2.8.1 Ein in PE-Vesikeln rekonstituierter OST-Komplex aus Hefe besitzt katalytische Aktivität	96
2.8.2 Heterolog in <i>E. coli</i> exprimierte <i>S.c.</i> Stt3 besitzt auch in Kombination mit <i>S.c.</i> Wbp1 und <i>S.c.</i> Ost1 keine Transferaseaktivität	98
2.8.3 Rekonstitution von zellfrei translatiertem <i>S.c.</i> Stt3, <i>S.c.</i> Ost1 und <i>S.c.</i> Wbp1	100
3. Zusammenfassung	102
3.1 Die C-terminale, luminale Domäne von <i>S.c.</i> Stt3 enthält essentielle Aspartatreste in konservierten DXD-Motiven	102
3.2 Analyse der Stt3-Homologen aus <i>C. jejuni</i> und <i>H. sapiens</i>	103
3.3 Das Stt3-Homolog <i>L.m.</i> 2191 unterstützt die Rolle von Stt3 als katalytisch aktive Unterseinheit	104
3.4 Fusionskonstrukte zwischen <i>S.c.</i> Stt3 und Homologen von <i>C. jejuni</i> , <i>H. sapiens</i> und <i>L. major</i> deuten innermolekulare Wechselwirkungen in Stt3 an	105
3.5 Der N-Terminus von <i>S.c.</i> Stt3 enthält Determinanten zum Einbau und zur Generierung eines katalytisch aktiven Proteins	106
3.6 Rekonstitution von Komponenten des OST-Komplexes in PE-Vesikeln	106
4. Materialien	108
4.1 Chemikalien und Enzyme	108
4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	111
4.2.1 Stämme	111
4.2.2 Plasmide	112
4.2.3 Konstruierte Plasmide	113
4.2.4 Oligonukleotide	118
5. Methoden	124
5.1 Anzuchtbedingungen und Medien	124
5.1.1 Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i>	124

5.1.2 Anzuchtbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	124
5.2 Molekularbiologische Methoden.....	125
5.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	125
5.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	125
5.2.3 Transformation von <i>E. coli</i>	126
5.2.4 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	126
5.2.5 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	127
5.2.6 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	128
5.2.7 PCR-Amplifikationen.....	128
5.2.8 Subklonierung in den Vektor pUC19 oder pBS	129
5.2.9 Klonierungen sowie Restriktionsanalysen	129
5.2.10 <i>Site-directed</i> Mutagenese	129
5.2.11 Genomische Epitopmarkierung von Proteinen aus <i>S. cerevisiae</i>	130
5.2.12 Sequenzanalysen.....	130
5.3 Biochemische Methoden	131
5.3.1 Isolierung von Rohmembranen	131
5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	132
5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	133
5.3.4 <i>Western Blot</i> Analyse	133
5.3.5 <i>Blue Native</i> Analyse	134
5.3.6 Metabolische Markierung der CPY aus <i>S. cerevisiae</i> mit ^{35}S -Methionin/Cystein	135
5.3.7 <i>In vitro</i> Transkription und Translation im Reticulocyten Lysat.....	137
5.3.8 Bestimmung der N-Oligosaccharyltransferase-Aktivität	137
5.3.9 Rekonstitution in PE-Vesikeln	138
5.3.10 Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H).....	140
5.4 Wachstumstests von <i>S. cerevisiae</i>	140
5.4.1 Tüpfeltest.....	140
5.4.2 Tetradenanalyse.....	140
6. Literaturverzeichnis	142

Abkürzungen

alg	<i>asparagine-linked glycosylation</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
BA	Benzamidin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C/M	Chloroform/Methanol (v/v)
C/M/H	Chloroform/Methanol/H ₂ O (v/v/v)
CFW	<i>Calcofluor White</i>
Ci	Curie
<i>C.j.</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CPY	Carboxypeptidase Y
C _{ter}	C-terminale, lösliche Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dol-P	Dolicholmonophosphat
Dol-PP	Dolicholpyrophosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldinitrotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EtSH	Mercaptoethanol
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HAc	Essigsäure
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>

IPTG	1-Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
LLO	<i>lipid-linked oligosaccharides</i>
<i>L.m.</i>	<i>Leishmania major</i>
Man	Mannose
mCPY	mature CPY, 4fach glykosyliert
MeOH	Methanol
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NP40	Nonidet-P40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
OG	Octylglukosid
ORF	<i>open reading frame</i>
OST	Oligosaccharyltransferase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SdM	<i>site-directed mutagenesis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
TM	Transmembranspanne(n)
TNT	<i>in vitro transcription and translation</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
t _s	temperatursensitiv
U	Units, Einheit der enzymatischen Aktivität
ÜN	über Nacht
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
WT Wildtyp

1. Einleitung

Die Modifikation von Proteinen ist ein weit verbreitetes Phänomen, welches in allen Domänen des Lebens zu finden ist. Als häufigste und komplexeste Modifikation schien N-Glykosylierung lange auf das Reich der Eukaryoten und Archaeen beschränkt zu sein (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Lechner und Wieland, 1989; Spiro *et al.*, 1979). Untersuchungen von *Campylobacter jejuni* belegten jedoch, dass ein vergleichbarer Vorgang auch in Eubakterien zu finden ist (Wacker *et al.*, 2002).

N-Glykosylierung stellt einen essentiellen Prozess dar, der von Niederen Eukaryoten bis hin zum Menschen hoch konserviert ist und bezeichnet eine Proteinmodifikation, bei welcher aktivierte Oligosaccharide cotranslational auf Asparaginreste naszierender Polypeptidketten übertragen werden (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Lehle und Tanner, 1995). Auch wenn der N-Glykosylierung bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann, weiß man, dass Glykoproteine maßgeblich an der Differenzierung und Entwicklung von Zellen beteiligt sind und Prozesse wie Zell-Zell-Kennung und Adhäsion beeinflussen (Varki, 1993). Eine tragende Rolle kommt wohl der richtigen Faltung von Proteinen zu, da bei Defekten in N-Glykosylierung die Akkumulation falsch gefalteter Polypeptide im Lumen des Endoplasmatischen Reticulum (ER) zu beobachten ist (Helenius, 1994; zusammengefasst in Caramelo und Parodi, 2007). Fehler in der N-Glykosylierung äußern sich beim Menschen in zum Teil gravierenden neurologischen und Entwicklungsstörungen, ein Krankheitsbild zusammengefasst unter dem sogenannten CDG-Syndrom (*congenital disorders of glycosylation*) (zusammengefasst in Lehle *et al.*, 2006). Auch wenn diese Beobachtungen an Höheren Eukaryoten erfolgten, wurden viele der grundlegenden Details dieser Proteinmodifikation aus Untersuchungen des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen, welche im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.1 Die eukaryotische N-Glykosylierung

Den zentralen Ort der N-Glykosylierung stellt das ER dar, in welchem in der Schlüsselreaktion das sog. *Core-Oligosaccharid* GlcNAc₂Man₉Glc₃ von seinem Lipidanker Dolicholpyrophosphat auf bestimmte Asparaginreste der naszierenden Polypeptidkette übertragen wird.

Die Assemblierung des Oligosaccharids, genannt *lipid-linked oligosaccharide* (LLO), erfolgt über einen konservierten Weg durch schrittweise Verknüpfung von Monosacchariden an dem Lipidträgermolekül Dolicholphosphat, welches in *S. cerevisiae* aus 14-18 Isopreneinheiten besteht (Lehle und Tanner, 1995). Zunächst wird an der cytoplasmatischen Seite mittels verschiedener Glykosyltransferasen DolPP-GlcNAc₂Man₅ gebildet. Durch ein sog. *Flipping* wird das lipidgebundene Heptasaccharid auf die lumrale Seite des ER transloziert, einem bislang noch unverstandenen Mechanismus an dem das Membranprotein Rft1 beteiligt ist (Helenius *et al.*, 2002). Im ER-Lumen werden weitere vier Mannosen und drei Glukosen angeheftet, wodurch der optimale Glykosyldonor DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ entsteht. Als Glykosyldonoren fungieren auf der cytoplasmatischen Seite die nukleotid-aktivierten Zucker UDP-GlcNAc und GDP-Man, im Lumen hingegen die lipidgebundenen Saccharide DolP-Man und DolP-Glc (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Wird eine naszierende Polypeptidkette nun durch das Translokon in das Lumen des ER transloziert, erkennt der heterooligomere Enzymkomplex *Oligosaccharyltransferase* (OST) bestimmte Asparaginreste des konservierten Akzeptorsequons Asn-X-Ser/Thr und katalysiert den Transfer des *Core-Oligosaccharids* auf selbiges (Abb. 1). Die Position X innerhalb dieses als Sequon bezeichneten Motivs kann jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein (Bause, 1983; Roitsch und Lehle, 1989). Zur Modifikation muss es innerhalb der Proteine jedoch noch andere Determinanten geben, da nur ungefähr 65 % der Asparaginreste des Sequons tatsächlich glykosyliert werden (Petrescu *et al.*, 2004).

Nach Übertragung des *Core-Oligosaccharids* auf das Protein wird dieses im ER und Golgi weiter prozessiert. Spezifische Glykosidasen und Glykosyltransferasen beginnen noch im ER mit sog. *Trimming*-Reaktionen, in denen durch Glukoseadditionen und -abspaltungen die richtige Faltung der Proteine gewährleistet wird. Kommt es hierbei zu Fehlern, werden die Proteine so lange im ER zurückgehalten, bis sie die richtige Konformation erreicht haben (Hammond *et al.*, 1994).

EINLEITUNG

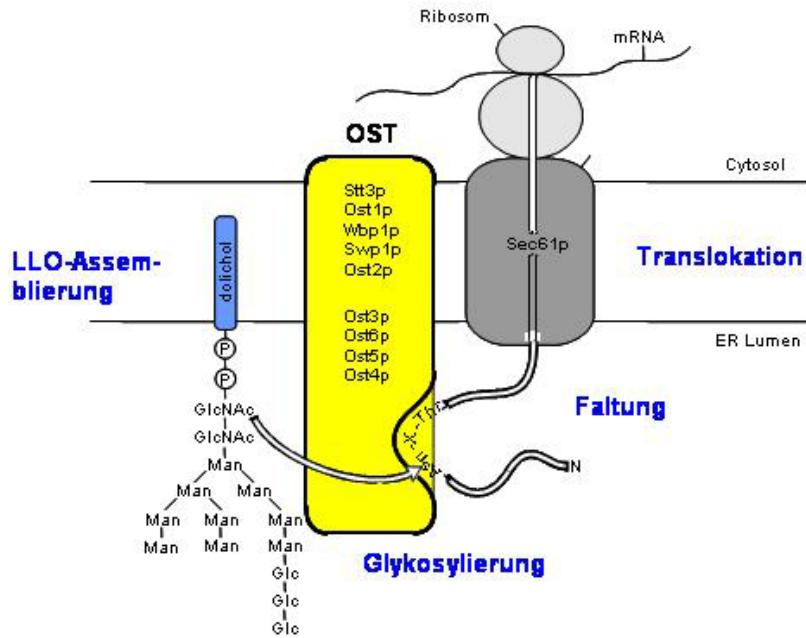


Abb. 1: Transfer des Core-Oligosaccharids auf Asparagin naszierender Polypeptidketten in *S. cerevisiae*.
Aus Knauer und Lehle, 1999a. Die Oligosaccharyltransferase (OST) katalysiert die kovalente Verknüpfung des Dolicholpyrophosphat gebundenen Core-Oligosaccharids GlcNAc₂Man₉Glc₃ mit Asparaginresten einer wachsenden Polypeptidkette. Dieser Prozeß erfolgt cotranslational, wenn das Protein bei Translation durch das Translokons Sec61 in das Lumen des ER geschleust wird. Stt3, Ost1, Wbp1, Swp1 und Ost2 sind essentielle Untereinheiten in der Bäckerhefe.

Intensive Untersuchungen der OST aus *S. cerevisiae* ergaben, dass der Komplex aus neun Untereinheiten besteht, wobei die Proteine Stt3, Ost1, Ost2, Wbp1 und Swp1 essentiell sind. Da die Isolierung des Komplexes schwierig ist, wurde zu Beginn von einer tetrameren Oligosaccharyltransferase, bestehend aus Ost1, Wbp1, Ost3 und Swp1, ausgegangen (Knauer und Lehle, 1994). Erst später konnten die Proteine Ost2, Ost4, Ost5, Ost6 und Stt3 als weitere Komponenten des Komplexes aus Bäckerhefe identifiziert werden (Knauer und Lehle, 1999a und b). Das in dieser Promotion untersuchte Protein Stt3 zum Beispiel blieb aufgrund seines diffusen, apparenten Laufverhaltens auf Höhe von Ost1 lange unentdeckt, nicht zuletzt weil es schwer über Coomassie- und Silberfärbung nachweisbar ist (Karaoglu *et al.*, 1997; Knauer und Lehle, 1999b).

Neben Hefe wurde die OST in den letzten Jahren auch aus anderen Organismen wie Mensch (Kelleher *et al.*, 2003), Schwein (Breuer und Bause, 1995), Hund (Kelleher *et al.*, 1992) und Huhn (Kumar *et al.*, 1994) isoliert. Auf diese Weise konnten einige zu Untereinheiten des Hefe-Komplexes homologe Proteine identifiziert werden. Beispielsweise wurden in allen untersuchten Wirbeltieren die zu Ost1 und Swp1 homologen Polypeptide Ribophorin I und II nachgewiesen. Es ist jedoch sicher nur eine Frage der Zeit, bis zumindest zu allen essentiellen Untereinheiten Homologe gefunden werden. Nicht lebensnotwendige Komponenten könnten im Laufe der Evolution verloren gegangen sein.

EINLEITUNG

Auch wenn die Zusammensetzung der OST aus Hefe bekannt ist, ist die Funktion der einzelnen Untereinheiten weitgehend ungeklärt. Untersuchungen wie Sequenzanalyse und Hydropathieplots zeigten für die Topologie zunächst, dass alle neun OST-Komponenten über Membranspannen in der ER-Membran verankert sind. Das vorhergesagte Modell ist in Abb. 2 angegeben.

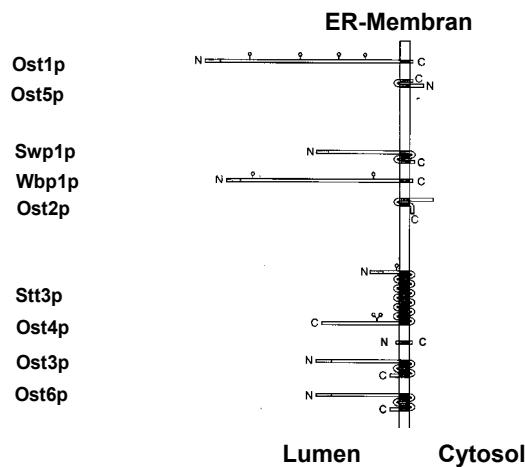


Abb. 2: Vorhergesagte Topologie für die Untereinheiten des OST-Komplexes aus *S. cerevisiae*. Aus Knauer und Lehle, 1999b. Gezeigt sind alle neun Untereinheiten der OST von Hefe, die mit einer oder mehreren Membranspannen in der ER-Membran verankert sind. Bei allen Untereinheiten, bis auf Ost2p und Ost5p, befindet sich am N-Terminus eine Signalsequenz, mit der sie in das Lumen des ER ragen. Bei Ost1p, Wbp1p und Stt3p sind potentielle Glykosylierungsstellen eingezeichnet.

Demnach ragen alle Untereinheiten bis auf Ost2, Ost5 und Ost4 mit dem N- oder C-Terminus in das Lumen des ER. Wie für die Topologie von Stt3 mittlerweile experimentell ermittelt ist, befindet sich der N-Terminus des Proteins nicht im Lumen des ER, sondern auf cytosolischer Seite (Kim *et al.*, 2005). Ob die vorhergesagte Orientierung für die anderen Untereinheiten stimmt, bleibt experimentell zu bestätigen. In den Proteinen Ost1, Wbp1 und Stt3 sind zudem potentielle N-Glykosylierungsstellen zu finden. *In vivo* Analysen zeigten, dass alle der in Ost1 und Wbp1 vorhergesagten Glykosylierungsstellen zwar besetzt, für die Aktivität der OST aber nicht essentiell sind. In Stt3 hingegen wird nur eine der Glykosylierungsstellen modifiziert, deren Mutation in Hefe jedoch zu Letalität führt (Kelleher *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). Zahlreiche Experimente zielen mittlerweile darauf ab, die Rolle jeder Untereinheit des Komplexes zu klären. Die wichtigste Frage ist zweifellos, von welcher Untereinheit die Katalyse des OST-Komplexes vermittelt wird. Eine wichtige Methode hierfür ist das *Cross-linking*. Im Laufe der Jahre wurde eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, in welchen unterschiedlichste Untereinheiten mit dem Glykosylierungssequon der Polypeptidkette quervernetzt werden konnten. Zunächst rückten die Experimente Ost1 als katalytisch aktive Untereinheit in den Mittelpunkt (Yan *et al.*, 1999). Spätere Versuche zeigten jedoch, dass neben Ost1 auch Stt3

EINLEITUNG

und Ost3 markiert wurden (Yan und Lennarz, 2002a). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass Ost1 als eine Art Chaperon fungiert, welches substratspezifisch N-glykosidische Modifikation unterstützt, jedoch selbst nicht katalytisch aktiv ist (Wilson *et al.*, 2005; Wilson und High, 2007).

Doch sollte man auch die Funktion nicht essentieller Untereinheiten nicht unterschätzen. Untersuchungen an Ost4 zeigten, dass eine Disruption des nur 36 Aminosäuren großen Proteins die Stabilität des OST-Komplexes erheblich beeinflusst (Knauer und Lehle, 1999a). Die beiden Polypeptide Ost3 und Ost6 zeigen erstaunlich ähnliche Hydropathieplots. Experimentelle Befunde zeigten, dass sie redundante Funktionen übernehmen und in Hefe in zwei unterschiedlichen Subkomplexen vorliegen. Demnach würde die OST in *S. cerevisiae* nicht aus neun, sondern aus acht Untereinheiten mit je Ost3 oder Ost6 bestehen (Chavan *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2005). Auch wenn beide Untereinheiten nicht essentiell sind, zeigt die Doppeldisruptante starke Unterglykosylierung (Knauer und Lehle, 1999b).

Als „heißester“ Kandidat für die katalytische Untereinheit gilt mittlerweile jedoch Stt3. Das am höchsten konservierte Protein des OST-Komplexes ragt mit seinem C-Terminus ins Lumen des ER und könnte dort an der Katalyse der OST-Reaktion beteiligt sein. Im Folgenden wird auf das Stt3 aus Hefe sowie seine Homologen aus anderen Organismen näher eingegangen.

1.2 Stt3 aus *Saccharomyces cerevisiae*, die am höchsten konservierte Untereinheit des OST-Komplexes

Der Name *STT3* tauchte zum ersten Mal 1992 in der Literatur auf, wurde hier jedoch nicht in Verbindung mit N-Glykosylierung beschrieben. Die japanische Arbeitsgruppe um Mitsuzawa isolierte auf der Suche nach temperatursensitiven Mutanten gegenüber dem Protein-Kinase C Inhibitor Staurosporin dieses Gen, worauf der Name *STT3* beruht (*staurosporine and temperature sensitive*) (Yoshida *et al.*, 1992). Der ORF codiert für ein 78 kDa großes Membranprotein, welches, wie inzwischen experimentell bewiesen, mit 11 Transmembranspannen in der ER-Membran verankert ist (Abb. 37). 1995 wurde von den Arbeitsgruppen Aebi und Lehle gezeigt, dass Stt3 sowohl für die *in vivo* als auch *in vitro* Aktivität des OST-Komplexes essentiell ist. Die Isolierung der Mutante *stt3-3* gab zudem einen Hinweis, dass es sich bei Stt3 um die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes handelt. Experimente zeigten, dass der Hefestamm an der Substratdiskriminierung beteiligt ist und *in vitro* den

EINLEITUNG

optimalen Donor DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ mit weitaus größerer Effizienz überträgt als das suboptimale Substrat DolPP-GlcNAc₂ (Zufferey *et al.* 1995).

Einen weiteren wichtigen Hinweis gab jedoch die hohe Konservierung von Stt3. Unter all den Untereinheiten kommen sicher nur die essentiellen Proteine Ost1, Ost2, Wbp1, Swp1 und Stt3 als katalytische Untereinheit in Frage, wobei Ost2 aufgrund seiner Topologie ausfällt (Abb. 2). Die Homologie von Ost1, Wbp1 und Swp1 im Vergleich zu ORFs Höherer Eukaryoten bewegt sich zwischen 20-40 %, Stt3 hingegen ist mit ca. 50 % die am höchsten konservierte Untereinheit (Knauer und Lehle, 1999a; Yan und Lennarz, 2002b). Die Konservierung erstreckt sich vor allem auf die C-terminale, luminale Domäne, die weit in das Lumen des ER ragt. Durch diese Topologie könnte der C-Terminus an der Katalysereaktion beteiligt sein, da er das von Heijne aufgestellte Kriterium erfüllt: Es wurde gezeigt, dass eine Akzeptorstelle mindestens 12-14 Aminosäurereste vom Transmembransegment entfernt sein muss, um als solche genutzt werden zu können (Nilsson und von Heijne, 1993). Folglich muss sich auch das aktive Zentrum der katalytischen Untereinheit in gleicher Position befinden.

Sequenzvergleiche verschiedener pro- und eukaryotischer Glycosyltransferasen ließen die Identifizierung sog. DXD-Motive zu. Am Beispiel der *MNN1* α-1,3-mannosyltransferase von *S. cerevisiae*, einem Typ II Membranprotein des medialen Golgiapparates, konnte gezeigt werden, dass die beiden Aspartatreste sowohl für die *in vivo* als auch *in vitro* Aktivität absolut essentiell sind. Der von diesem Enzym benötigte Cofaktor Mangan wird von diesen Aspartatresten koordiniert (Wiggins und Munro, 1998). Die Röntgenstruktur der N-Acetylglukosaminyltransferase GnTI aus Hase lieferte schließlich weitere Einblicke in den Mechanismus. In der Reaktion, in welcher GlcNAc von UDP-GlcNAc auf die Mannose von GlcNAc₂Man₅ übertragen wird, fungiert Mangan als Cofaktor. Die sauer geladenen Aspartatreste koordinieren das zweiwertige Ion im aktiven Zentrum, über welches wiederum die negativ geladenen Phosphatgruppen des Lipidträgers gebunden sind (Ünligil und Rini, 2000). Ein Vergleich der Sequenz von Stt3 mit den ORFs Höherer Eukaryoten erlaubte die Identifizierung konservierter DXD-Motive in der C-terminalen Domäne. Es lässt sich postulieren, dass sie dort analoge Funktionen wie in GnTI erfüllen.

Wie in 1.3 näher dargestellt wird, codiert das Eubakterium *Campylobacter jejuni* eine N-Glykosylierungsmaschinerie, in welcher das zu Stt3 homologe Protein PglB als Oligosaccharyltransferase fungiert und Proteine mit N-Glykanketten modifiziert. Die Tatsache, dass in diesem Organismus keine weiteren OST-Homologe vorkommen, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei Stt3 um die katalytische Einheit des OST-Komplexes handeln könnte.

EINLEITUNG

Nicht unerwähnt bleiben sollten die bereits erwähnten *Cross-linking* Experimente, in welchen Stt3 an naszierende Polypeptidketten quervernetzt wurde (Karamyshev *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2003). Da in ähnlichen Experimenten jedoch früher Ost1 kovalent gebunden wurde, sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu genießen und sicherlich nicht als „wasserdichter“ Beweis anzusehen.

Ende letzten Jahres ist es gelungen, den C-Terminus von Stt3 zu kristallisieren. Die Expression der C-terminalen, löslichen Domäne des Homologs aus dem Archaebakterium *Pyrococcus furiosus* in *E. coli* erlaubte die erste Röntgenkristallstruktur (Igura *et al.*, 2007).

1.3 Proteinglykosylierung im pathogenen Eubakterium *Campylobacter jejuni*

Lange schien die N-Glykosylierung auf das Reich der Eukaryoten und Archaebakterien beschränkt zu sein. Dies änderte sich jedoch mit der Entdeckung N-glykosidisch verknüpfter Glykanketten in *Campylobacter jejuni*. Das begeißelte Eubakterium gehört zur Gruppe der Zoonoseerreger und löst bei Übertragung von Tier auf den Menschen entzündliche Durchfallerkrankungen aus. Es ist bekannt, dass zahlreiche Virulenzfaktoren pathogener Bakterien Glykanketten tragen, die zumeist O-glykosidisch gebunden sind. Bei Befall eines Wirtes sind diese Glykoproteine an Adhäsion und Invasion beteiligt und wichtige Komponenten der Immunogenität. In *C. jejuni* konnte gezeigt werden, dass neben O-glykosidisch auch N-glykosidisch modifizierte Proteine vorliegen und diese für effiziente Invasion des Bakteriums von Nöten sind (Karlyshev *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2004). Szymanski und Mitarbeiter konnten ein Gencluster in *C. jejuni* beschrieben, dessen Produkte hohe Ähnlichkeit mit der Aminosäurenzusammensetzung von Enzymen der Lipopolysaccharidbiosynthese aus *E. coli* besitzen (Szymanski *et al.*, 1999). Durch Identifizierung der Proteine PEB3 und CgpA konnte gezeigt werden, dass das Pgl-Operon (*protein glycosylation*) für Enzyme der N-Glykosylierung codiert, welche die beiden Oberflächenpolypeptide mit α -verknüpftem N-Acetylgalaktosamin modifizieren (Linton *et al.*, 2002). Doch erst die Rekonstitution des gesamten *Clusters* in *E. coli* lieferte den letzten Beweis, dass es genau dieses Operon ist, welche alle für N-Glykosylierung nötigen Informationen codiert (Wacker *et al.*, 2002).

Eine genaue Analyse der Proteine PEB3 und CgpA bzw. der daran verknüpften Zucker mit nano-NMR- und MS-Technik ergaben, dass das Glykan aus dem Heptasaccharid GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc- β 1,3]-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-Bac besteht, wobei Bacilosamin eine 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-Glukose ist.

EINLEITUNG

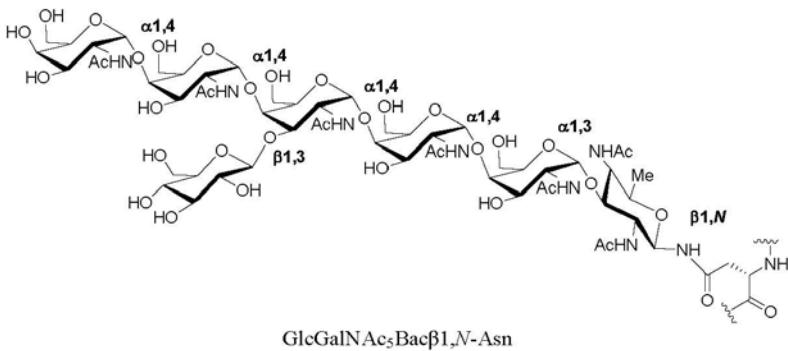


Abb. 3: Schema des an Asparagin gebundenen Oligosaccharids aus *Campylobacter jejuni*. Aus Weerapana und Imperiali, 2006. Der Zucker ist ein Heptasaccharid und über Bacilosamin kovalent an einen Asparaginrest gebunden.

Analog zu Eukaryoten, findet die kovalente Verknüpfung dieses Oligosaccharidrestes an einem Asparagin im konservierten Sequon Asn-X-Ser/Thr statt (Young *et al.*, 2002). Detaillierte Untersuchungen der bakteriellen Konsensussequenz ergaben jedoch, dass außerdem eine negativ geladene Aminosäure an Position -2 benötigt wird, um glykosyliert zu werden (Kowarik *et al.*, 2006b). Somit stellt in *C. jejuni* die Akzeptorsequenz D/E-Y-N-X-S/T (wobei Y, X ≠ P) das minimale, aber nicht ausreichende Sequon für N-Glykosylierung dar (Nita-Lazar *et al.*, 2005). Wie die Kristallstruktur von PEB3 ergab, befindet sich das Sequon in einer gut exponierten Lage auf der Proteinoberfläche, was eine Anheftung des Glykorestes ohne Umorientierung der lokalen Struktur ermöglicht (Rangarajan *et al.*, 2007). Auch *in vivo* und *in vitro* Experimente von Aebi und seinen Mitarbeitern sprechen dafür, dass die bakterielle N-Glykosylierung im Gegensatz zur eukaryotischen posttranslationalen geschieht. Ferner scheint eine spezifische Struktur erforderlich, die im nativen Protein die Glykosylierungsstellen in einem räumlich flexiblen Bereich präsentiert und so ein optimales Substrat für die Transferase darstellt (Kowarik *et al.*, 2006a).

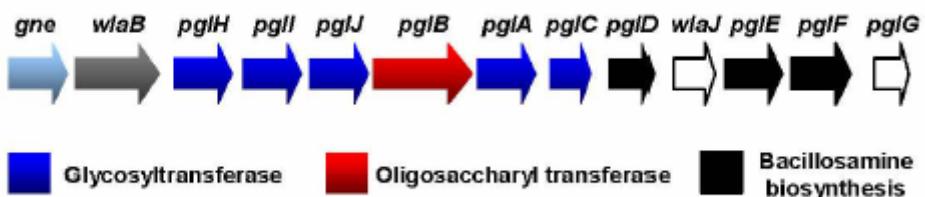


Abb. 4: Das Pgl-Gencluster aus *Campylobacter jejuni*. Aus Weerapana und Imperiali, 2006. Blau unterlegte Pfeile stehen für Glycosyltransferasen, schwarz unterlegte Pfeile für Enzyme der Bacilosaminsynthese codierende Gene. Das so synthetisierte Heptasaccharid wird von der Oligosaccharyltransferase PglB (rot unterlegter Pfeil) auf Proteine übertragen.

EINLEITUNG

Obwohl Zusammensetzung und Struktur der N-Glykanketten von Glykoproteinen aus *C. jejuni* schon seit einiger Zeit identifiziert werden konnten, gelang es erst im Laufe der letzten Jahre, den einzelnen Genprodukten ihre Funktion zuzuordnen. Anhand von Sequenzhomologien zu Enzymen des O-Antigen Biosyntheseweges von Bakterien wie *Neisseria meningitidis* und mittels bioinformatischer und Mutationsanalyse, konnten die in Abb. 3 schwarz und blau unterlegten Gene als codierende Einheiten der Assemblierung des Heptasaccharids zugeordnet werden (Glover *et al.*, 2005a; Glover *et al.*, 2006; Weerapana *et al.*, 2005). Die Assemblierung erfolgt an der dem Cytosol zugewandten Seite der Cytoplasmamembran, wobei anders als bei Eukaryoten Undekaprenol als Lipidanker fungiert (Feldman *et al.*, 2005). Das vollständige Heptasaccharid BacGlaNAc₅Glc flippt letztendlich mit Hilfe des ABC-Transporters WlaB in den periplasmatischen Raum, wo es von der bakteriellen OST übertragen wird (Abb. 5).

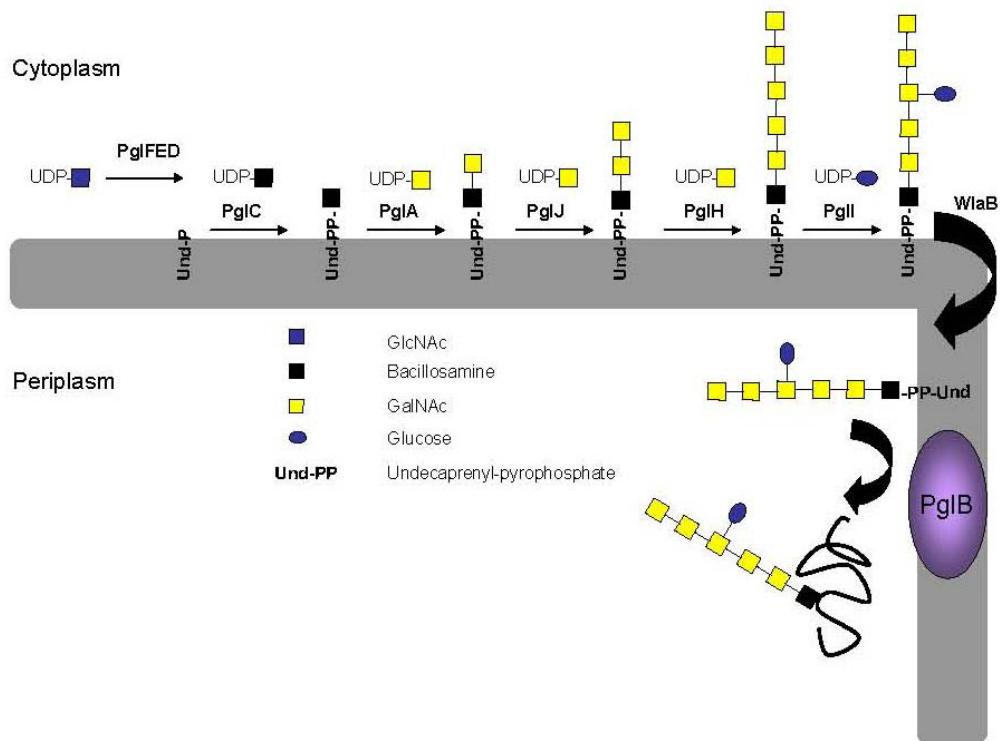


Abb. 5: Schema der LLO-Assemblierung und des Transfer auf ausgesuchte Proteine mittels PgIB in *C. jejuni*. Aus Weerapana und Imperiali, 2006. Die Assemblierung des LLOs erfolgt an der cytoplasmatischen Seite und wird nach Transfer auf die periplasmatische Seite vom Stt3-Homolog PgIB auf Asparaginreste ausgesuchter Proteine übertragen.

Die bakterielle OST wird vom Gen *PGLB* codiert. PgIB ist ein 82 kDa grosses, integrales Membranprotein, das über 10-12 vorhergesagte Transmembranspannen in der periplasmati-

EINLEITUNG

schen Membran verankert ist. Das Protein zeigt Homologie zu Stt3 aus unterschiedlichen Organismen, vor allem jedoch in der Sequenz des C-Terminus einschließlich des WWDYG-Motivs. Zielgerichtete Mutagenesen in dieser Region als auch der gesamte *knock-out* von PglB unterbindet N-Glykosylierung (Wacker *et al.*, 2002). Wie gezeigt werden konnte, ist der Funktionsausfall nicht letal, die Immunogenität der betroffenen Eubakterien jedoch stark reduziert (Larsen *et al.*, 2004).

Nachdem das Pgl-Operon für keine weiteren homologen Untereinheiten des OST-Komplexes von Hefe und Höheren Eukaryoten codiert, muss postuliert werden, dass nur dieses eine Protein den Transfer des Saccharids katalysiert. *In vitro* Tests bestätigen die katalytische Rolle von PglB, in welchen heterolog exprimierte Protein das synthetische Disaccharid Bacillosamin- α -1,3-GalNAc vom Lipidanker Undekaprenol auf ein Peptid KDFNVSKA überträgt (Glover *et al.*, 2005b). Im Zuge dieser Experimente zeigte sich eine weitere Eigenschaft, welche die bakterielle OST von der in Eukaryoten unterscheidet: PglB zeigt breite Substratspezifität, wodurch Glykane unterschiedlicher Zusammensetzung und Größe von einem Undekaprenolanker auf ausgesuchte Sequons übertragen werden. Sofern an Undekaprenol geknüpft, scheint die einzige strukturelle Restriktion eine C-2 Acetamido-Gruppe am reduzierenden Ende des Zuckers zu sein. Es wird postuliert, dass diese funktionelle Gruppe in die katalytische Aktivität involviert ist und ein möglicherweise während der Reaktion entstehendes Oxonium-Ion in seinem Übergangszustand stabilisiert (Feldmann *et al.*, 2005; Wacker *et al.*, 2006).

1.4 N-Glykosylierung in parasitären Protisten

Parasitäre Protozoen, zur Domäne der Eukaryoten gehörend, werden dem Reich der Protisten zugeordnet. Die meisten Mitglieder dieser Abteilung sind sowohl medizinisch als auch ökonomisch von großer Bedeutung, da sie vor allem in Entwicklungsländern der Auslöser einer Reihe chronischer Krankheiten sind. Die wohl prominentesten Vertreter dieser Parasiten stellen Arten der Familie Trypanosomatidae dar: *Trypanosoma cruzi* gilt als Auslöser der Chagas-Krankheit, *T. brucei* verursacht die Schlafkrankheit. Eine Infektion mit Unterarten der Gattung Leishmania führt zu unterschiedlichen Versionen so genannter Leishmaniose, welche je nach Erreger auf Regionen der Haut beschränkt bleibt (cutane Leishmaniose) oder aber schwieriger verlaufende Krankheitsbilder bedingt (viscerale Leishmaniose). In jedem Fall ist eine Therapie von Nöten, auch wenn eine vollständige Heilung meist nicht möglich ist (Vickerman, 1976). Der Parasit benötigt zu seiner Entwicklung zwei Wirte, die Sandfliege und meist Vertebraten, in welchen er komplexe Lebenszyklen mit unterschiedlichen Differenzierungsformen durchläuft. Während dieser Lebenszyklen nun prägen die Parasiten in nicht

EINLEITUNG

genau festgelegter Folge ein Repertoire an ungefähr 100 Glykoproteinen auf ihrer Oberfläche aus, die sog. VSG (*variable surface glycoproteins*). In der Plasmamembran verankert, bilden circa 10^7 dieser Moleküle unterschiedliche Antigendeterminanten und verhelfen dem protozoischen Organismus durch Änderung der präsentierten Glykoproteine, der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Parodi *et al.* belegten Anfang der 80er Jahre, dass in *Trypanosoma cruzi* N-Glykosylierung am konservierten Sequon Asn-X-Ser/Thr stattfindet (Parodi *et al.*, 1982a, 1982b, 1983). Analysen zeigten, dass der Zucker aus zu Höheren Eukaryoten analogen Bausteinen wie N-Acetylglukosamin und Mannose besteht. Je nach Art und Lebenszyklus, konnten unterschiedlich lange Strukturen von GlcNAc₂Man₆₋₉ identifiziert werden, die an Dolichopyrophosphat assembliert waren. Die Besonderheit in der Glykosylierung dieser Organismen, das Fehlen endständiger Glukosen, wird auf einen Defekt in der Bildung von DolP-Glc zurückgeführt (zusammengefasst in Parodi, 1993). Nachdem für Säuger- und Pilzsysteme gezeigt werden konnte, dass eine Entfernung der endständigen Glukose von DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ die Transferrate deutlich senkt (Sharma *et al.*, 1981; Spiro *et al.*, 1979), stellte sich die Frage nach der Substratspezifität der protozoischen OST. Die Arbeitsgruppe von Parodi zeigte 1988, dass die Vertreter *Trypanosoma cruzi*, *Leptomonas samueli*, *Cryptosporidium fasciculata* und *Blastocryptidium culicis* artenunabhängig sowohl GlcNAc₂Man₉Glc₁₋₃ als auch GlcNAc₂Man₇₋₉ mit nahezu gleicher Rate *in vitro* auf synthetisches Hexapeptid übertragen (Bosch *et al.*, 1988). Vergleichsexperimente mit Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* und Rattenleber ergaben, dass eukaryotische OSTs eine Präferenz für das Vollängensaccharid GlcNAc₂Man₉Glc₃ besitzen, wobei die Transfereffizienz 20-25 mal größer ist als mit unvollständigen Zuckerstrukturen (Bosch *et al.*, 1988). Anhand von Genomanalysen kann postuliert werden, dass *T. cruzi* nur ein zu Stt3 homologes Protein, aber keines der anderen OST-Untereinheiten enthält und die OST nur aus diesem einen Polypeptid besteht. Expression in *S. cerevisiae* ergab, dass Stt3 aus *T. cruzi* in den OST-Komplex eingebaut wird, dort jedoch seine Fähigkeit verliert, auch kürzerkettige Strukturen zu übertragen. Somit ist die Selektivität für den optimalen Donor DolPP-GlcNAc₃Man₉Glc₃ eine durch den Komplex vermittelte Eigenschaft und nicht durch das Stt3 selbst (Castro *et al.*, 2006). Auf diese Weise stellen Hefe und Höhere Eukaryoten eine uniforme Glykanstruktur sicher, die für einen geregelten Zellaufbau, Stoffwechsel und das gesamte Überleben nötig ist. Parasitäre Protozoen hingegen fördern durch breite Substratspezifität ihre Variabilität an Zuckerstrukturen auf ihrer Zelloberfläche, wodurch sie möglicherweise der Immunantwort des Wirtes entgehen.

Neben Vertretern der Familie Trypanosomatidae wurden auch Stt3-Homologe aus anderen protozoischen Parasiten isoliert: Das Homolog aus *Entamoeba histolytica* (Gutiérrez *et al.*,

EINLEITUNG

2000) und ein zu 47 % homologes Protein aus *Toxoplasma gondii*, welches im überexprimierten Zustand *S.c.*Stt3 funktionell ersetzen kann (Shams-Eldin *et al.*, 2005).

1.5 Stt3-homologe Proteine aus Höheren Eukaryoten

Wie bereits erwähnt, konnten OST-Komplexe aus Höheren Eukaryoten zwar isoliert werden, ein Nachweis aller zu Hefe homologen Proteine steht zum Teil jedoch noch aus. Dies galt auch für das humane Stt3. Lissy *et al.* klonierten bereits 1996 einen ORF aus Mensch, den sie zunächst TMC (*conserved transmembrane protein*) nannten (Lissy *et al.*, 1996). Erst später im Zuge der Sequenzierung des Mäuse- und Menschengenoms stellte sich heraus, dass es sich um ein zu *S.c.*Stt3 homologes Protein handelt. Weitere Sequenzanalysen verschiedener eukaryotischer Stt3-Homologe zeigten, dass Höhere Eukaryoten wie Insekten, Pflanzen und Vertebraten zwei Isoformen des Proteins codieren. Es wird angenommen, dass die Unterfamilie Stt3-A früh während der Evolution multizellulärer Organismen durch Duplikation eines Vorläufer-Stt3 entstanden ist. Ein Vergleich der Sequenzen zeigte bereits, dass sich die beiden Paraloge in ihrer Aminosäurenzusammensetzung unterscheiden. Detaillierte Untersuchungen mit Hundepankreas mikrosomen belegten letztendlich, dass OST-Komplexe mit Stt3-A oder Stt3-B unterschiedliche enzymatische Eigenschaften besitzen (Kelleher *et al.*, 2003).



Abb. 6: Vorhergesagte Organisation von Stt3-A und Stt3-B. Aus Kelleher *et al.*, 2003. Gezeigt sind die beiden Homologe von Stt3 aus Hund. Schwarze Balken geben vorhergesagte Transmembranspannen an. Luminale Segmente sind grau unterlegt, cytosolische Loops schräg gestreift. Die nichthomologen Verlängerungen am N- und C-Terminus und eine Insertion in STT3-B sind durch entgegengesetzte Streifen angegeben. Die Bäumchen geben potentielle Glykosylierungsstellen an. Die beiden Isoformen besitzen 59 % Homologie.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich, besitzt Stt3-B aufgrund von Verlängerungen am N- und C-Terminus, einer Insertion im letzten cytoplasmatischen Loop und einer zusätzlichen potentiellen Glykosylierungsstelle ein höheres Molekulargewicht als Stt3-A. Studien der OST ergaben, dass stets beide Proteine exprimiert werden, der Gehalt beider jedoch zelltyp- und gewebspezifisch variiert. OST-Komplexe mit Stt3-A zeigen größere Aktivität und vor allem größere Selektivität für den optimalen Donor DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Die OST mit Stt3-B hingegen ist weniger aktiv und transferiert auch kürzere Substrate (Kelleher *et al.*, 2003). Diese Selektivität unterstreicht die zentrale Rolle von Stt3 innerhalb des OST-Komplexes und zeigt,

EINLEITUNG

dass multizelluläre Organismen die Fähigkeit entwickelt haben, zellspezifisch Glykanheterogenität herzustellen und zu sichern.

1.6 Überblick über die charakteristischen Eigenschaften der OST aus unterschiedlichen Organismen

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die charakteristischen Eigenschaften der N-Glykosylierung aus den Organismen *S. cerevisiae*, *C. jejuni*, *T. cruzi* und *H. sapiens*.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Homo sapiens</i>
Akzeptorsequenz	Asn-X-Ser/Thr (X ≠ Pro)	Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr (X ≠ Pro)	Asn-X-Ser/Thr (X ≠ Pro)	Asn-X-Ser/Thr (X ≠ Pro)
Lipidanker	Dolichol-Pyrophosphat	Undekaprenol-Pyrophosphat	Dolichol-Pyrophosphat	Dolichol-Pyrophosphat
Glykanzusammensetzung	GlcNAc ₂ Man ₉ Glc ₃	BacGalNAc ₅ Glc (breite Spezifität)	GlcNAc ₂ Man ₅₋₉	GlcNAc ₂ Man ₉ Glc ₃
OST-Komplex-bestandteile	Ost1, Ost2, Ost3/6, Ost4, Ost5, Swp1, Wbp1, Stt3	Stt3 (PglB)	Stt3	analog <i>S. cerevisiae</i>
katalytische Untereinheit	Stt3	Stt3 (PglB)	Stt3	Stt3-A/Stt3-B (59 % Homolog)
Größe (aa)	718	713	798	705/ 826
Molekulargewicht (kDa) (apparentes MW)	81 (62-64)	82 (58)	87	78 (60-70)/ 90 (80-85)
Lokalisation	ER Membran ragt in ER Lumen	Cytoplasmamembran ragt in den periplasmatischen Raum	ER Membran ragt in ER Lumen	ER Membran ragt in ER Lumen

Tab. 1: Zusammenfassender Überblick über die Zusammensetzung und charakteristischen Eigenschaften der OST aus *S. cerevisiae*, *C. jejuni*, *T. cruzi* und *H. sapiens*

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit waren zwar alle Untereinheiten des OST-Komplexes von *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, jedoch wenig bis gar nichts über die Funktion der einzelnen Proteine bekannt. Auf der Suche nach der katalytischen Untereinheit rückte neben *Cross-linking* Experimenten vor allem die hohe Konservierung des offenen Leserahmens Stt3 als „heissen“ Kandidaten in den Fokus (1.2). Anhand des Sequenzvergleichs der C-terminalen Domäne von Stt3 aus unterschiedlichen Organismen konnten konservierte DXD-Motive identifiziert werden, deren gezielter Aminosäureaustausch mehr über eine mögliche Rolle im aktiven Zentrum und die Funktion von Stt3 in Erfahrung bringen sollte (2.1).

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das zu Stt3 homologe Protein PglB aus *C. jejuni*, welches in diesem Organismus eine N-Glykosylierung katalysiert, *S.c.*Stt3 funktionell ersetzen kann. Nachdem dies, wie sich zeigte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht der Fall war, sollte der Einfluß des in *S.c.*Stt3 essentiellen Glykosylierungsmotivs DNNTWNNT auf die Funktion von *C.j.*PglB untersucht werden, da dieses möglicherweise zur Ausbildung einer katalytisch aktiven Konformation benötigt wird (2.2).

Darüber hinaus sollten die vier Stt3-Homologe 2191-2194 des Protozoons *L. major* auf ihre katalytische Aktivität und Fähigkeit zur Komplementation einer *S.c.*Stt-Defizienz untersucht werden. Wie für Vertreter der Familie Trypanosomatidae bekannt ist, zeigt die OST aus diesen Organismen breite Substratspezifität (1.4). Daher sollte geprüft werden, ob *L.m.*Stt3 bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* diese Eigenschaft beibehält oder eine Präferenz für das dreifach glukosylierte Oligosaccharid zeigt. Ferner sollte gezeigt werden, ob katalytisch aktives *L.m.*Stt3 im Komplex oder als Monomer außerhalb in der ER-Membran lokalisiert ist (2.3).

Zudem wurde das Stt3-Homolog Stt3-A aus *H. sapiens* auf seine Fähigkeit untersucht, *S.c.*Stt3 funktionell zu ersetzen (2.4).

Nachdem nur das Stt3 aus *L. major* in *S. cerevisiae* katalytische Aktivität zeigte, sollte versucht werden, durch Domänenauktausche zwischen Stt3 aus Bäckerhefe und *C. jejuni*, *L. major* oder *H. sapiens* funktionelle Chimäre zu erzeugen. Hierbei lagen Fusionen der Transmembranspannen mit den C-terminalen, löslichen Domänen eines anderen Stt3-Homologs im Vordergrund (2.6).

Da die Fusionskonstrukte alle negativ waren, sollte untersucht werden, ob die gesamte Aminosäuresequenz von *S.c.*Stt3 zur Aktivität des Proteins benötigt wird. Hierüber sollten Hybri-

EINLEITUNG

de zwischen den Stt3-Homologen aus Mensch und Hefe Aufschluss geben, wozu Fusionen in der 2. und in der 7. Membranspanne von *H.s.*Stt3-A mit *S.c.*Stt3 konstruiert wurden. *Blue Native* Analysen dieser Konstrukte sollten zudem zeigen, welche Determinanten von *S.c.*Stt3 für den Einbau in den Komplex verantwortlich sind (2.7).

Da die OST in *L. major* und *C. jejuni* nur aus dem Stt3-Homolog besteht, müsste *S.c.*Stt3 allein auch katalytische Aktivität besitzen. Hierzu wurde Stt3 heterolog in *E. coli* exprimiert als auch zellfrei im Reticulocyten Translationssystem synthetisiert und auf OST-Aktivität untersucht. Schließlich sollte durch Co-Expression von Stt3 mit Ost1 und Wbp1, zweier weiterer essentieller Untereinheiten, versucht werden, einen katalytisch aktiven Minimalkomplex zu assemblieren. Um die natürliche Lipidumgebung der OST nachzuahmen, sollten die Proteine in PE-Vesikeln rekonstituiert werden (2.8).

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Funktionelle Untersuchungen zum Stt3 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Stt3, einer essentiellen Untereinheit des OST-Komplexes. Wie für alle anderen Proteine des oligomeren Enzyms, war zu Beginn der Promotion wenig über die Funktion dieses Polypeptids innerhalb des Komplexes bekannt. Ziel war es, Stt3 als die katalytisch aktive Untereinheit zu identifizieren bzw. mehr über seine Funktion innerhalb des OST-Komplexes zu erfahren.

2.1.1 Die C-terminale Domäne von Stt3 enthält konservierte DXD-Motive

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war die hohe Konservierung von Stt3, vor allem die des C-Terminus, ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Untereinheit um die katalytisch aktive Komponente des OST-Komplexes handeln könnte (1.2). Ein Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von Stt3 der Organismen Hefe, Drosophila, *C. elegans* und Mensch zeigt große Homologie, wobei zahlreiche Aspartatreste entweder einzeln oder in *Clustern* des Motivs DDX oder DXD angeordnet vorliegen (Abb. 7). Da für einige Glykosyltransferasen gezeigt werden konnte, dass diese sauren Aminosäuren durch Koordination zweiwertiger Ionen und Fixierung der Phosphate lipidgebundener Oligosaccharide direkt an der Katalyse beteiligt sind, lässt sich gleiches für die konservierten Motive in Stt3 vermuten (Wiggins und Munro, 1998). Auch das ebenso im Stt3-Homolog PglB aus *C. jejuni* zu findende konservierte Motiv WWDYG spricht dafür, dass Stt3 das aktive Zentrum des Komplexes birgt. Es wird gemutmaßt, dass dieses Motiv bei der Erkennung des Sequons Asn-X-Ser/Thr beteiligt ist (Wacker *et al.*, 2002; Young *et al.* 2002).

Die essentielle Bedeutung dieser Aminosäuren zeichnete sich bereits bei Untersuchungen in der Diplomarbeit ab, wo gezielte Austausche einzelner Aspartate nach Alanin teilweise den Ausfall des ganzen *S.c.*Stt3 zur Folge hatten und einen letalen Phänotyp erzeugten (vgl. Diplomarbeit Katrin Hese, 2003).

ERGEBNISSE und DISKUSSION

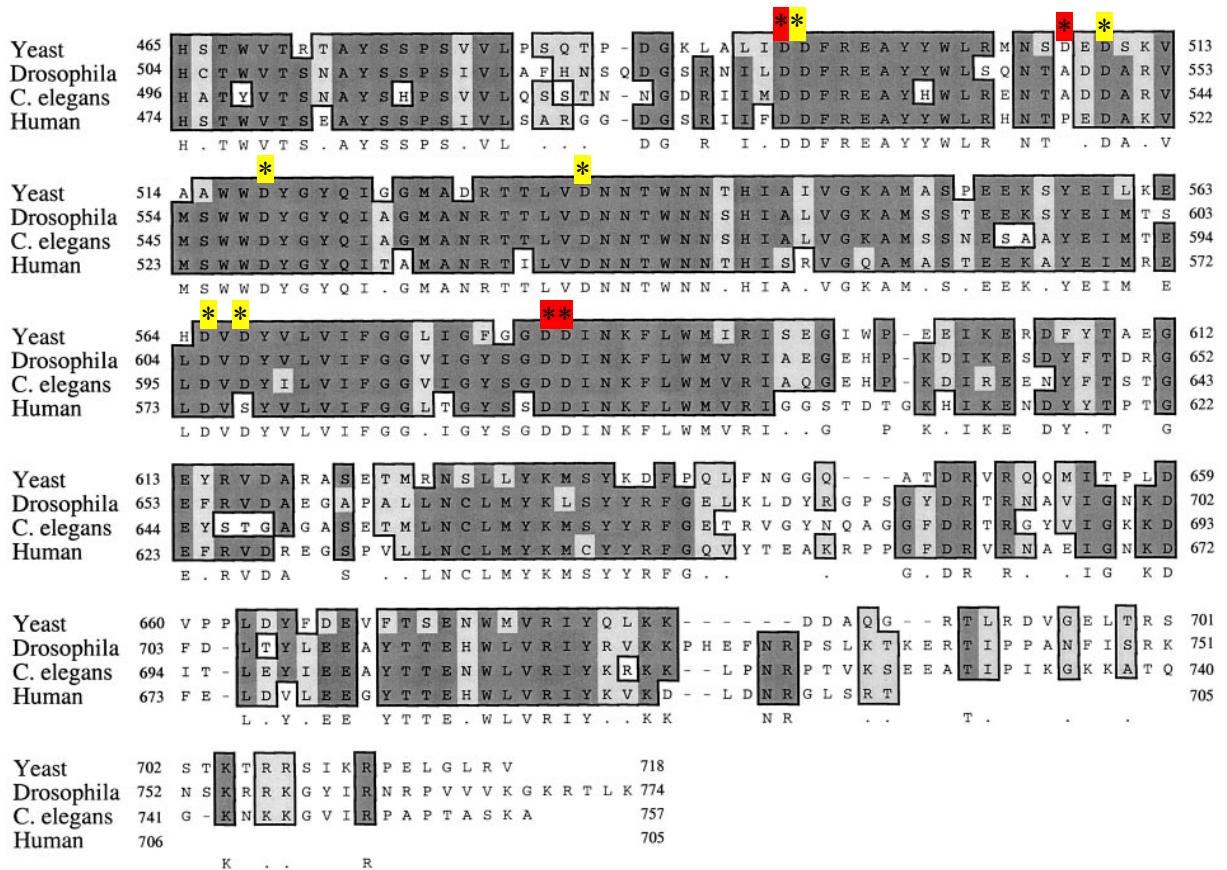


Abb. 7: Sequenzalignment der C-terminalen Domäne von Stt3 aus Hefe, Drosophila, *C. elegans* und Mensch. Aus Yan und Lennarz, 2002b. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt und eingerahmt, konservative Austausche hingegen hellgrau unterlegt und eingerahmt. Mutierte Aspartate sind mit einem * gekennzeichnet, wobei in der Diplomarbeit ausgetauschte gelb, im Rahmen der Doktorarbeit vorgenommene rot unterlegt sind.

In Abb. 7 sind die während der Diplomarbeit mutierten Aminosäuren mit einem gelb unterlegten Stern gekennzeichnet. Auf diese wird genauer in der Zusammenfassung und Diskussion am Ende dieses Kapitels eingegangen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit eingeführte Mutagenesen sind mit einem rot unterlegten Stern markiert (Abb. 7) und in Tab. 2 zusammengefasst.

Aminosäureaustausch	Motiv	mögliche Funktion	eingeführt
D494A	494DDF ₄₉₆	Koordination von Mn ²⁺	diese Arbeit
D508A	508DED ₅₁₀	Koordination von Mn ²⁺	diese Arbeit
D582A	582DDI ₅₈₄	Koordination von Mn ²⁺	diese Arbeit
D583A	582DDI ₅₈₄	Koordination von Mn ²⁺	diese Arbeit
D495A	494DDF ₄₉₆	Koordination von Mn ²⁺	Diplomarbeit K.Hese
D510A	508DED ₅₁₀	Koordination von Mn ²⁺	Diplomarbeit K.Hese
D518A	516WWDG ₅₂₀	Erkennung der Akzeptorsequenz N-X-S/T	Diplomarbeit K.Hese
D534A	534DNNT ₅₃₇	Glykosylierungsstelle von Stt3p	Diplomarbeit K.Hese
D565A	565DVD ₅₆₇	Koordination von Mn ²⁺	Diplomarbeit K.Hese
D567G	565DVD ₅₆₇	Koordination von Mn ²⁺	Diplomarbeit K.Hese

Tab. 2: Einführung von Punktmutationen in konservierte Motive der C-terminalen Domäne von Stt3. Als template diente *S.c.STT3* im Vektor pCR®-BluntII-TOPO®.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Anhand dieser gezielten Mutationen sollte der Einfluss auf die Funktionalität des OST-Komplexes von Hefe überprüft werden.

2.1.2 *Calcofluor White* und *Caffeine* zeigen keinen Einfluß auf das Wachstum der DXD-Mutanten

Das *S.c.STT3*-Gen lag aus den Untersuchungen der Diplomarbeit bereits kloniert vorhanden vor. Der Subklonierungsvektor pCR®-BluntII-TOPO® enthält mit 5'- und 3'-*NotI*-Schnittstellen das vollständige Gen, welches über PCR mit Hilfe des *Quick Change® Site-Directed Mutagenesis* Kit von Stratagene sowie entsprechenden Oligonukleotiden mutagenisiert wurde. Nach Verifizierung des erfolgten Austausches durch Sequenzierung wurde das Gen über die *NotI-Sites* in das *high-copy*-Plasmid NEV-N-leu umkloniert. Durch den *PMA1* Promotor gewährleistet dieses Plasmid Überexpression des Proteins, wobei auf den Auxotrophiemarker Leucin selektioniert wird. Als Hefestamm wurde die Mutante *stt3-7* gewählt, welche die Punktmutation S552P in der C-terminalen Domäne von Stt3 trägt. Dieser Austausch erzeugt einen temperatursensitiven Phänotyp oberhalb 30°C sowie eine Unterglykosylierung von Glykoproteinen (Spirig *et al.*, 1997). Ziel war es nun zu überprüfen, ob die plasmidär codierten *STT3*-Allele ein funktionelles Protein erzeugen, welches das genomische *stt3-7* aus dem Komplex verdrängt und den *t_s*-Phänotyp supprimiert.

Zunächst sollte der Einfluss der mutierten Stt3-Versionen auf Wachstumsebene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme bei der permissiven Temperatur von 25°C sowie der restriktiven Temperatur von 30°C angezogen. Da bekannt ist, dass Unterglykosylierung in *S. cerevisiae* die Assemblierung einer geschwächten Zellwand zur Folge hat, wurde zudem der Einfluss von *Caffeine* und *Calcofluor White* (CFW) untersucht. Diese beiden Chemikalien wirken als Zellwandstressoren, indem sie selbst die Assemblierung einer intakten Zellwand verhindern. Während CFW die Bildung von Chitinmikrofibrillen hemmt (Elorza *et al.*, 1993), wirkt *Caffeine* auf die Proteinkinase C (Pkc1). Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellintegrität durch Regulation der Zellwandbiosynthese (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992). Ist Pkc1 mutiert, zeigen Hefezellen zum einen Osmolabilität, zum anderen Sensitivität gegenüber *Caffeine* (Costigan *et al.*, 1992). Sollten die in Tab. 2 genannten Mutanten eine geschwächte Zellwand zur Folge haben, würden sie eine durch die Chemikalien hervorgerufene, zusätzliche Beeinträchtigung der Zellwandassemblierung nicht überstehen.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

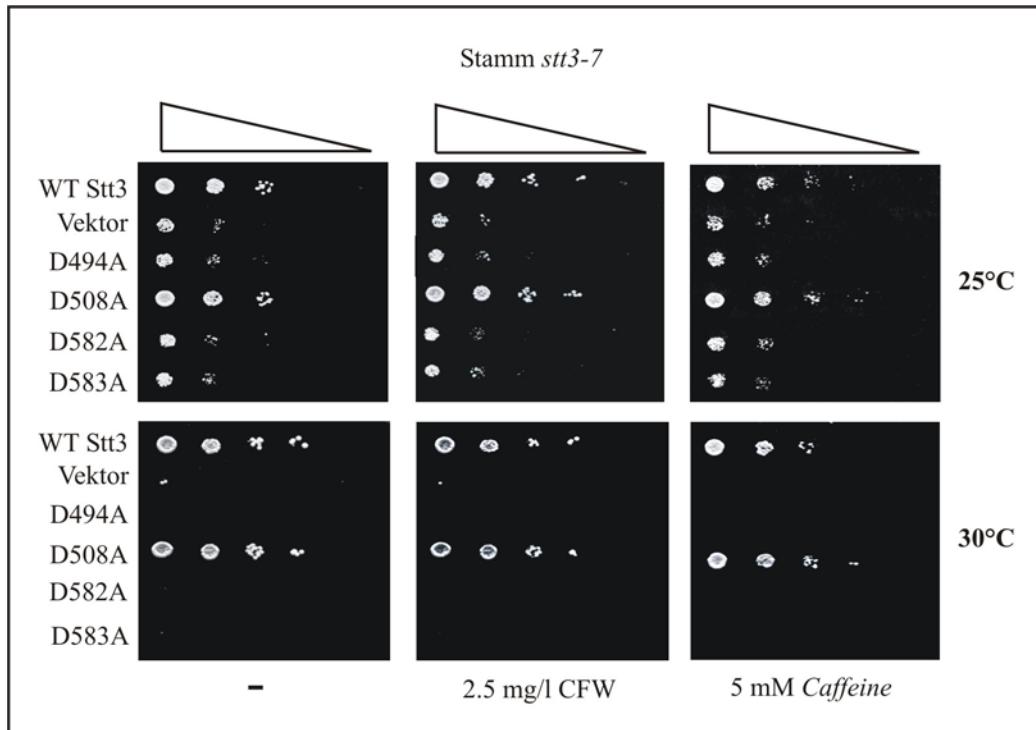


Abb. 8: Wachstumsanalyse der Stt3-Mutanten im Stamm *stt3-7*. Die Zellen mit Leervektor NEV-N-leu und den jeweiligen plasmidkodierten *STT3*-Mutanten wurden in YNB-d.o.-leu bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ 1 angezogen. 1 OD₆₀₀-Einheit wurde geerntet und in 1 ml Minimalmedium aufgenommen. Von Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ wurden je 3 µl auf YNB-d.o.-leu-Platten +/- 2.5 mg/l CFW bzw. 5 mM Caffeine getüpfelt und für 2 Tage bei 25 bzw. 30°C inkubiert.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, supprimieren sowohl das Wildtypprotein Stt3 (WT Stt3) als auch die Mutante D508A den temperatursensitiven Phänotyp von *stt3-7*. Vergleicht man das Wachstum aller Mutanten bei 25°C miteinander, so wird deutlich, dass die komplementierende Variante des Stt3-Proteins D508A bereits bei dieser permissiven Temperatur besser wächst als die Mutanten D494A, D582A, D583A sowie der Stamm *stt3-7* (Vektor) selbst. Diese drei Transformanten zeigen den temperatursensitiven Phänotyp des Hintergrundstamms *stt3-7*, d.h. sie wachsen nur langsam bei 25°C und gar nicht mehr bei der restriktiven Temperatur von 30°C.

Vergleicht man nun das Verhalten bei Zugabe der Zellwandstressoren, sieht man, dass weder *Calcofluor White* noch *Caffeine* in den hier verwendeten Konzentrationen das Wachstum der Hefezellen beeinflusst. Da die Temperatursensitivität nur durch Einbau eines nicht komplett funktionellen Stt3-Proteins in die OST hervorgerufen werden kann, ist das Ergebnis erstaunlich. Es scheint, als ob die Zellwand von *stt3-7* selbst als auch bei Überexpression von D494A, D582A und D583A zu gering geschwächt ist, so dass der Zusatz der beiden Chemikalien bei 25°C keinen letalen Phänotyp erzeugt. Es bleibt nicht auszuschließen, dass eine höhere Konzentration einen Effekt zeigen würde, wobei für *Caffeine* gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung von 5mM auf 6.5 mM bereits zu Letalität des Wildtyps führte.

2.1.3 Die Mutante D508A revertiert den Unterglykosylierungsphänotyp des temperatursensitiven Stammes *stt3-7*

Wie in Abb. 8 gezeigt, supprimiert die Mutante D508A den temperatursensitiven Phänotyp von *stt3-7*, die Stt3-Allele D494A, D582A und D583A hingegen nicht. Um die Frage zu klären, ob dies auf Basis von N-Glykosylierung geschieht, wurde der Glykosylierungsstatus des vakuolären Glykoproteins Carboxypeptidase Y (CPY) untersucht. Hierzu wurden die Mutanten sowie Wildtyp-Stt3 und der Hintergrundstamm *stt3-7* metabolisch markiert und der Einbau von ^{35}S -Methionin in die CPY durch Autoradiographie detektiert (Abb. 9).

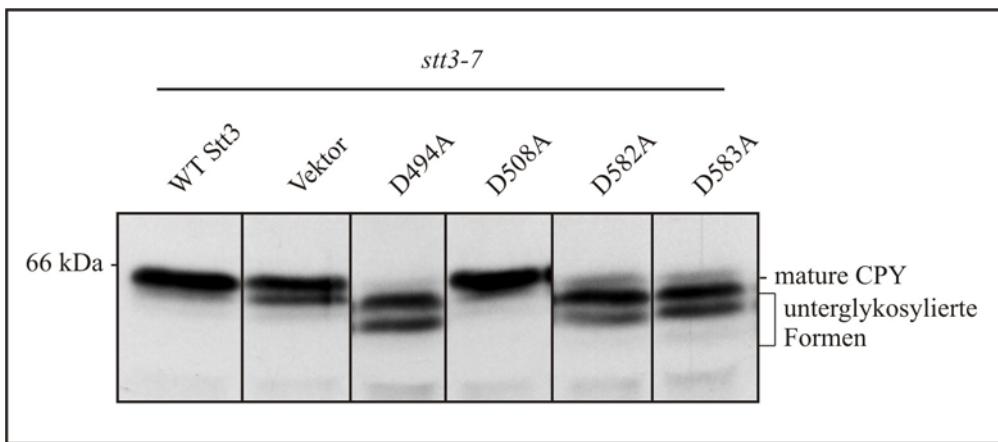


Abb. 9: In vivo Markierung der CPY von Stt3-Mutanten sowie Wildtyp-Stt3 und Vektorkontrolle im Stamm *stt3-7*. Die Zellen mit Plasmid NEV-N-leu-STT3 wurden mit ^{35}S -Methionin markiert und über anti-CPY Antikörper spezifisch die CPY präzipitiert. Über Protein A-Sepharose wurde der Antigen-Antikörper-Komplex präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die CPY durch Fluorographie detektiert.

Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Wachstumstests (Abb. 8), supprimiert das Wildtyp-Stt3 und die Mutante D508A den Phänotyp von *stt3-7*. Wie in einem gewöhnlichen Wildtyp-stamm trägt die CPY hier vier Glykanketten, welche als mature Form bezeichnet wird. In Stämmen mit Defekten in der N-Glykosylierung können je nach Schweregrad eine bis alle vier Ketten ausfallen. So findet man in *stt3-7* (Vektor) neben der maturen Form auch die einfach unterglykosylierte Variante der CPY. In den Mutanten D494A, D582A und D583A hingegen zeichnet sich eine wesentlich stärkere Unterglykosylierung ab: Neben der einfach unterglykosylierten CPY ist auch die Form, der zwei Ketten fehlen zu beobachten. Somit ist zum einen gezeigt, dass die in Abb. 8 dokumentierte Temperatursensitivität aus Hypoglykosylierung resultiert. Zum anderen deutet die Tatsache, dass in den Mutanten D494A, D582A und D583A eine stärkere Unterglykosylierung als im Hintergrundstamm *stt3-7* zu beobachten ist darauf hin, dass die drei STT3-Allele nicht funktionelle Proteine codieren, die in den Komplex eingebaut werden und dort ansässiges, genomisch codiertes *stt3-7* verdrängen. Im

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Falle von D508A ist das Protein funktionell und erzeugt bei Einbau Komplexe mit Wildtypaktivität.

2.1.4 D494A, D582A und D583A führen zu einer reduzierten *in vitro* Aktivität der Oligosaccharyltransferase

Um die Frage zu klären, inwiefern die eingeführten Mutationen die Aktivität des OST-Komplexes beeinflussen, wurde in einem *in vitro* Test der Transfer von Oligosacchariden auf das glykosylierbare Hexapeptid Tyr-Asn-Ser-Thr-Ser-Val untersucht. Wie bereits in 1.2 erwähnt, beeinflusst Stt3 die Substratspezifität des OST-Komplexes (Knauer und Lehle, 1999). Aus diesem Grund wurde neben dem optimalen Glykosyldonor DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ auch das minimale Substrat Chitobiose DolPP-GlcNAc₂ eingesetzt. Die Ergebnisse des Aktivitäts-tests sind in Tab. 3 dargestellt.

Stamm	OST-Aktivität mit	
	DolPP-GlcNAc ₂	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₉ Glc ₃
Wildtyp SS328	100 %	100 %
<i>stt3-7</i> (Vektor)	42 %	79 %
WT-Stt3 in <i>stt3-7</i>	99 %	118 %
D494A in <i>stt3-7</i>	19 %	44 %
D508A in <i>stt3-7</i>	84 %	98 %
D582A in <i>stt3-7</i>	21 %	46 %
D583A in <i>stt3-7</i>	17 %	43 %

Tab. 3: *In vitro* Aktivitätstest der OST in den einzelnen Mutanten im Stamm *stt3-7* mit DolPP-GlcNAc₂ und DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ als Glykosyldonor. Je Test wurden 100 µg Rohmembranen eingesetzt, welche in Minimalmedium bei 25°C angezogen wurden. Als Akzeptor diente das Hexapeptid YNSTSV. Beide Reaktionen wurden für 10 min bei 24°C inkubiert. Die Aktivität des Wildtypstamms SS328 wurde gleich 100 % gesetzt, die Werte der anderen Stämme darauf bezogen.

Vergleicht man mit Wildtyp, so zeigt der Hintergrundstamm *stt3-7* bereits reduzierte Aktivität mit dem Vollängenoligosaccharid. Noch deutlicher ist der Defekt mit dem suboptimalen Glykosyldonor DolPP-GlcNAc₂, hier ist die Transferrate auf um mehr als die Hälfte reduziert. Ein klares Indiz, dass die Punktmutation in *stt3-7* die Funktionalität von Stt3 und letztendlich die Substratspezifität des OST-Komplexes beeinflusst. Die Tests beweisen, dass die in Abb. 9 beobachtete Unterglykosylierung in *stt3-7* auf die auf ca. 80 % reduzierte Aktivität mit dem Vollängenoligosaccharid zurückzuführen ist. Im Falle des Wildtyp-Stt3 sowie der Mutante D508A findet man in Übereinstimmung mit der Komplementation des Phänotyps von *stt3-7* (Abb. 8 und 9) mit beiden Oligosacchariddonoren in etwa die Übertragungsrate des Wildtyps SS328. In den Mutanten D494A, D582A und D583A hingegen ist eine deutliche Senkung der Transferrate im Vergleich zu *stt3-7* zu beobachten. Auch hier deckt sich die Unterglykosylie-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

rung der CPY (Abb. 9) mit der erniedrigten OST-Aktivität (Tab. 3). Die Ergebnisse bekräftigen die Vermutung aus 2.1.3, dass es sich um dominant-negative Mutanten handelt, die bei Einbau in den Komplex das genomisch codierte *stt3-7* verdrängen. Da die resultierenden Komplexe inaktiv sind, muss die in diesen Stämmen gemessene Aktivität vom Hintergrundstamm *stt3-7* stammen.

2.1.5 Die Mutanten D494A, D582A und D583A erzeugen einen letalen Phänotyp

Anhand der in 2.1.3 und 2.1.4 dargestellten Ergebnisse lässt sich folgern, dass die Mutanten D494A, D582A und D583A kein funktionelles Protein erzeugen. Die stärker ausgeprägte Unterglykosylierung der CPY (Abb. 9) und auch die drastisch reduzierte *in vitro* Aktivität (Tab. 3) im Vergleich zum Hintergrundstamm *stt3-7* lassen den Schluß zu, dass die mutierten Stt3-Proteine zwar in den Komplex eingebaut werden, dieser jedoch nicht aktiv ist. Einzig durch Hintergrundaktivität von *stt3-7* können die analysierten Transformanten wachsen.

Um dies zu klären, wurden die Stt3-Gene D494A, D582A und D583A über homologe Rekombination ins Genom des diploiden Hefestamms W303a/α integriert. In Abb. 10 ist das Vorgehen bei der Klonierung sowie die Integration ins Genom schematisch dargestellt.

Über *Eco*RI/*Not*I-Verdau wurden die mutierten *STT3*-Allele aus dem Vektor NEV-N-leu ausgeschnitten. Durch eine interne *Eco*RI-Schnittstelle in *STT3* nach 134 bp im Gen, erhielt man eine vom N-Terminus her verkürzte Version, welche in das integrative Plasmid pRS406 (Selektionsmarker Ura) kloniert wurde. Durch erneuten Verdau mit *Spe*I wurde im Gen nach 144 bp des neuen N-Terminus geschnitten und der so linearisierte Vektor in den diploiden Hefestamm W303 a/α transformiert. Über homologe Rekombination erfolgte Integration ins Genom, wodurch zwei unterschiedliche Varianten an *STT3*-Genen entstanden sind: Zum einen ein Vollängenkonstrukt mit dem intakten N-Terminus des genomisch codierten Stt3, gefolgt vom Rest des mutierten Allels aus dem Plasmid und dem *URA3*-Gen. Zum anderen die verkürzte Version ohne Promotor und Start-Codon, wodurch kein Protein exprimiert werden kann.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

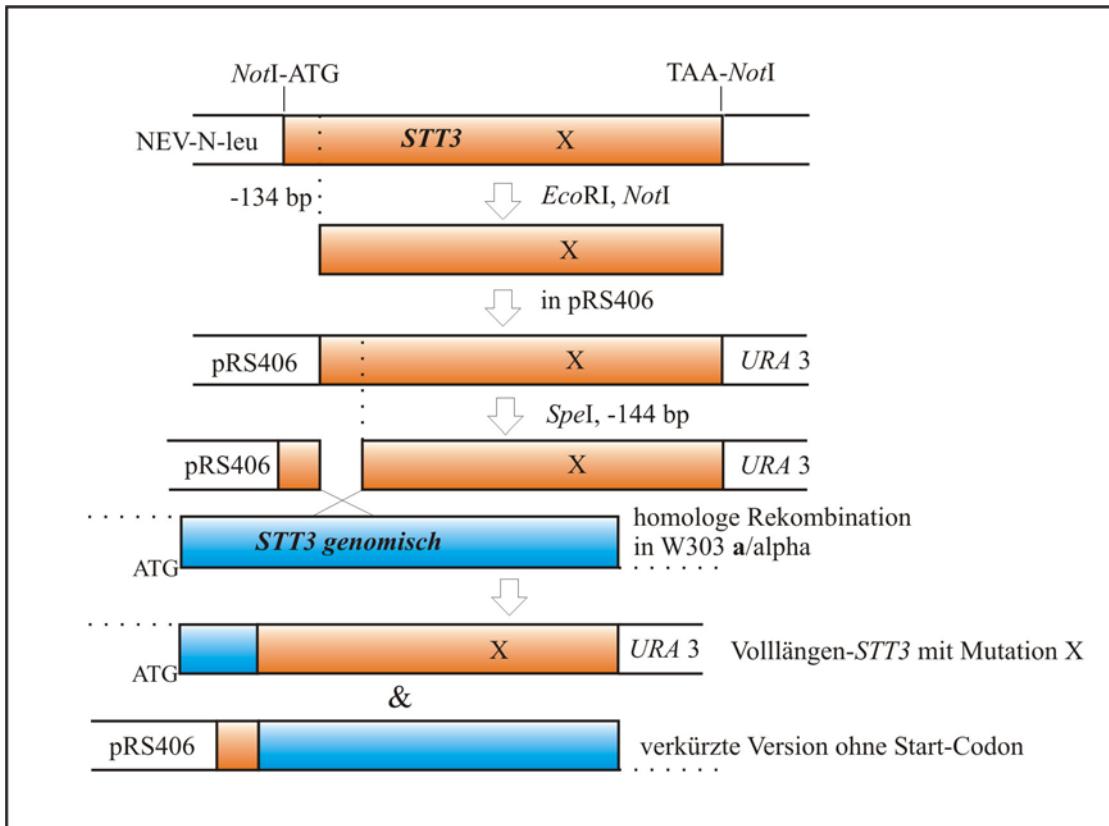


Abb. 10: Schematische Darstellung der Klonierung der mutierten *STT3*-Allele sowie Integration ins Genom. Eine vom N-Terminus verkürzte Version der mutierten *STT3*-Gene wurde in das integrative Plasmid pRS406 umkloniert. Über Verdau mit *SpeI* wurde das Plasmid im Gen geschnitten, somit linearisiert und in den diploiden Hefestamm W303 *a/a* transfomiert. Über homologe Rekombination erfolgte Integration der mutierten *STT3*-Allele ins Genom.

Durch Anzucht auf YNB-d.o.-ura selektionierte positive Hefetransformanten wurden auf Sporulationsmedium ausgestrichen und für 5 Tage bei 25°C inkubiert. Nach erfolgter Sporulation wurden diese wie in 5.4.2 angegeben weiterbehandelt und mit Hilfe eines Mikromanipulators separiert. Das Ergebnis ist in Abb. 11 dargestellt.

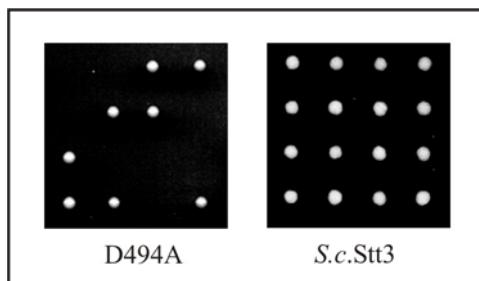


Abb. 11: Tetradenanalyse von D494A sowie WT-Stt3 in W303 *a/a*. Die Zellwände der sporulierten Tetraden wurden mit Zymolyase angedaut, mit Hilfe eines Mikromanipulators separiert und auf Vollmedium abgelegt. Die Inkubation bei 25°C für 3 Tage ergab obiges Muster für die Mutante D494A sowie *S.c.Stt3* (Positivkontrolle).

Abb. 11 zeigt für die Mutante D494A eine 2:2 Segregation. Stellvertretend für die Mutanten D582A und D583A, welche den gleichen Phänotyp haben (Daten nicht gezeigt), bleibt zu folgern, dass diejenigen haploiden Zellen, welche eine Kopie des von W303 *a/a* codierten *STT3*-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Gens besitzen, wachsen können. Umgekehrtes gilt für die Zellen, welche eine Kopie des mutierten Stt3 exprimieren. Somit führt die Expression der *STT3*-Allele D494A, D582A und D583A zu einem letalen Phänotyp. Betrachtet man sich die Situation mit genomisch integriertem WT-Stt3 (*S.c.*Stt3) und D508A (letztere Daten nicht gezeigt), den beiden *STT3*-Allelen, welche auch im Wachstumstest sowie den *in vivo* und *in vitro* Analysen Komplementation des *stt3-7* Phänotyps zeigten (Abb. 8; Abb. 9; Tab. 3), sieht man, dass alle vier haploiden Zellen wachsen können. Übereinstimmend mit den vorherigen Daten erzeugen diese beiden Varianten ein funktionelles Protein, wodurch alle Sporen der Tetrade wachstumsfähig sind. Die Analyse in den Mutanten D494A, D582A und D583A hingegen ist als eindeutiger Beweis anzusehen, dass der Austausch dieser Aspartatreste die Expression eines funktionellen Stt3 verhindert.

2.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie in 2.1.1 erwähnt, wurde bereits im Zuge der Diplomarbeit damit begonnen, hoch konservierte Aspartatreste in der C-terminalen Domäne von *S.c.*Stt3 zu mutieren. Um nun die Rolle dieser Aminosäuren und ihre Bedeutung in der Funktionalität von Stt3 zu diskutieren, ihre Signifikanz für die katalytische Aktivität des OST-Komplexes zu erfassen, werden diese Mutationen mit einbezogen. Sämtliche eingeführten Aminosäureaustausche sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Aminosäureaustausch	Motiv	Komplementation des <i>stt3-7</i> Phänotyps	Tetradenanalyse/ Segregation	durchgeführt während
D494A	$^{494}\text{DDF}_{496}$	-	2:2	diese Arbeit
D495A	$^{494}\text{DDF}_{496}$	+	-	Diplomarbeit K.Hese
D508A	$^{508}\text{DED}_{510}$	+	4:0	diese Arbeit
D510A	$^{508}\text{DED}_{510}$	+	-	Diplomarbeit K.Hese
D518A	$^{516}\text{WWDYG}_{520}$	-	2:2	Diplomarbeit K.Hese
D534A	$^{534}\text{DNNT}_{537}$	-	2:2	Diplomarbeit K.Hese
D565A	$^{565}\text{DVD}_{567}$	-	2:2	Diplomarbeit K.Hese
D567G	$^{565}\text{DVD}_{567}$	+	4:0	Diplomarbeit K.Hese
D582A	$^{582}\text{DDI}_{584}$	-	2:2	diese Arbeit
D583A	$^{582}\text{DDI}_{584}$	-	2:2	diese Arbeit

Tab. 4: Zusammenfassung aller Punktmutationen in der C-terminalen Domäne von *S.c.*Stt3 mit resultierendem Phänotyp im Stamm *stt3-7*. Zur Bestimmung des Phänotyps wurde in den in der Diplomarbeit erzeugten Mutanten, analog der in dieser Arbeit untersuchten, das Wachstum bei 25°C und 30°C sowie der Glykosylierungsstatus der CPY analysiert und durch *in vitro* Aktivitätstests bestätigt.

Wie durch Sequenzvergleiche pro- und eukaryotischer Glykosyltransferasen bekannt ist, enthalten diese Enzyme sogenannte DXD-Motive in ihrem aktiven Zentrum (Wiggins und Munro, 1998). Anhand von Röntgenstrukturanalysen der N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnT

ERGEBNISSE und DISKUSSION

I) aus Hase konnte schließlich die genaue Einbindung der Aspartatreste in die Glykantransferreaktion aufgeklärt werden: GnTI katalysiert die Übertragung eines GlcNAc-Restes von dem aktivierten Donor UDP-GlcNAc auf die Mannose des Akzeptors GlcNAc₂Man₅, wobei Mangan als Cofaktor fungiert. Die Analysen zeigten, dass hierbei die Manganionen von den sauren Aminosäureresten des DXD-Motivs komplexiert werden, welche wiederum über die negativ geladenen Sauerstoffatome der Pyrophosphate des UDP-GlcNAc gebunden sind. Nach Transfer des Zuckers dienen die Metallionen dazu, um die am UDP entstehende negative Ladung zu neutralisieren. Neben den in DXD-Motiven angeordneten Aspartatresten, wird ein weiteres D außerhalb dieses Motivs benötigt. Als Brønsted Base deprotoniert es die Hydroxylgruppe des Akzeptors, wodurch die Nucleophilie des Angriffs am GlcNAc-Rest gesteigert wird (Ünligil und Rini, 2000). Weitere Untersuchungen ergaben, dass neben DXD- auch XDD-Folgen im aktiven Zentrum von Glycosyltransferasen zu finden sind. Ebenso kann die Stelle von Aspartat mit einem Glutamat ersetzt werden (Tarbouriech *et al.*, 2001). Hieraus bleibt zu folgern, dass zur Komplexierung der Manganionen zwei negativ geladene Aminosäuren, Asp oder Glu, benötigt werden, welche entweder unmittelbar nebeneinander oder durch eine Aminosäure getrennt vorliegen.

Wie aus Tab. 4 ersichtlich, konnten sechs essentielle Aspartatreste identifiziert werden, welche über eine Strecke von ca. 100 Aminosäuren in der C-terminalen Domäne von *S.c.Stt3* verteilt sind. Sämtliche mutierten Aminosäuren sind mit ihrem jeweiligen Motiv schematisch in Abb. 12 dargestellt.

		*D495A	*D510A
465	HSTWVTRTAYSSPSVVLFSQTPDGK LALI	DDF	REAYYWLRMNS DED SKYAA 515
		*D494A	*508A
	*D518A	*D534A	
516	WWDYG YQIGGMADRTTLV DNNT WNNTNHIAIVGKAMASPEEKSYEILKEH 564		
	*D565A	*D583A	
565	DVD YVLVIFGGLIGFGG DDI NKFLWMIRISEGIWPEEKIKERDFYTAEGEV DAR 617		
	*D567G	*D582A	
618	ASETMRNSLLYKMSYKDFQLFNNGQATDRVQQMITPLDPFLDYFDEVFTS 672		
673	ENWMVRIYQLKKDDAQGRTLDRVGLTRSSKTRRSIKRPELGLRV 718		

Abb. 12: Sequenz der C-terminalen Domäne von *S.c.Stt3* mit eingeführten Punktmutationen. Die zielgerichteten Mutationen sind mit * gekennzeichnet sowie mit DxxxA/G beschrieben. Das zugehörige Motiv ist fett rot gedruckt und eingerahmt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Wie Mutationen in dem Motiv $_{494}DDF_{496}$ zeigten, ist das erste Aspartat D494 essentiell, D495 hingegen nicht. Analysen des Reporterproteins CPY in D494A zeigten eine stärkere Unterglykosylierung als der Hintergrundstamm *stt3-7* (Abb. 9). Hingegen war für D495A zu beobachten (siehe Diplomarbeit, 2003), dass die Mutation ein funktionelles Protein erzeugt, man fand sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Wildtypaktivität. Trotz hoher Konservierung beider Aspartatreste bis zum Mensch (Abb. 7), scheint das Motiv nicht für die Koordination von Mn^{2+} zuständig zu sein. Gleiches ist für das Motiv $_{508}DED_{510}$ zu vermuten: Hier war sowohl in der Mutante D508A (Abb. 9) als auch in D510A (Diplomarbeit, 2003) Komplementation des *stt3-7* Phänotyps der CPY zu beobachten. Da D508 im Lauf der Evolution nicht konserviert wurde, ist das Ergebnis der Mutation dieser Aminosäure nicht erstaunlich. Die Vermutung, es könnten die beiden folgenden Glutamat- und Aspartatreste ($_{509}E/DD_{510}$) an der Koordination von Mn^{2+} beteiligt sein, wurde durch Analyse von D510A widerlegt. Obwohl hoch konserviert, wird durch den Austausch funktionelles Protein erzeugt. Somit ist auch dieses Motiv nicht an der Katalyse der OST-Reaktion beteiligt.

Die Untersuchungen der Folge $_{565}DVD_{567}$ im Rahmen der Diplomarbeit zeigten, dass die Mutante D567G den Unterglykosylierungsphänotyp von *stt3-7* komplementiert, sowohl im Wachstum als auch auf Ebene der CPY. Wie der Sequenzvergleich zeigt, ist D567 in Mensch nicht konserviert erhalten, an seiner Stelle findet man ein Serin (Abb. 7). So spricht es dafür, auch wenn der Austausch von D565 gegen die neutrale Aminosäure Alanin einen letalen Phänotyp erzeugt, dass dieses Sequon möglicherweise eine andere Funktion innerhalb von Stt3 ausübt.

Einzig $_{582}DDI_{584}$ könnte die Funktion eines DXD- bzw. DDX-Motivs besitzen. So zeigt der OST-Test der Mutanten D582A und D583A mit dem Vollängenoligosaccharid DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ mit ca. 45 % und dem minimalen Donor DolPP-GlcNAc₂ mit nur 20 % weniger Aktivität als der Hintergrundstamm *stt3-7* (Tab. 3). Auch die Tetradenanalyse belegt, dass der Einbau beider Proteine nicht funktionelle Komplexe erzeugt und einen letalen Phänotyp zur Folge hat (Abb. 11). Da die beiden Aspartate von Hefe bis zum Mensch konserviert erhalten geblieben sind (Abb. 7), könnte es durchaus sein, dass sie im aktiven Zentrum von Stt3 lokalisiert sind und dort über Komplexierung der Manganionen an der Katalyse beteiligt sind.

Ein weiteres Ziel der Mutagenese war der Aspartatrest im Motiv $_{534}DNNTWNNT_{541}$. Wie inzwischen bekannt ist, handelt es sich bei $_{539}NNT_{541}$ um eine Glykosylierungsstelle von Stt3, welche *in vivo* besetzt ist. Mutationen in und um die Akzeptorsequenz ergaben, dass die Mo-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

difikation essentiell für die Funktion des OST-Komplexes ist (Li *et al.*, 2005). Auch der hier eingeführte Aminosäureaustausch führte zu einem letalen Phänotyp. Möglicherweise wird durch die Mutation die Glykosylierung von Stt3 verhindert, wodurch das Protein einen Konformationswandel vollzieht und nicht mehr aktiv ist.

In einem weiteren Fokus stand das Motiv $_{516}\text{WWDYG}_{520}$, welches nicht nur von Hefe bis Mensch, sondern sogar im pathogenen Eubakterium *Campylobacter jejuni* als hoch konserviertes Sequon in der C-terminalen Domäne von Stt3 zu finden ist. Wie bereits in 1.3 erwähnt, codiert das Pgl-Gencluster aus *C. jejuni* eine Glykosylierungsmaschinerie, wobei das Stt3-Homolog PglB letztendlich als katalytisch aktive Einheit ein an einem Undekaprenolanker assembled Oligosaccharid auf ausgewählte Sequons überträgt (Wacker *et al.*, 2002). Da die Zusammensetzung des Saccharids, bestehend aus einer Hexose, fünf N-Acetylhexosaminen und einer Trideoxydiacetamidohexose (Young *et al.*, 2002), von der aus Eukaryoten divergiert, wird davon ausgegangen, dass das Motiv nicht bei der direkten Katalyse beteiligt ist. Vielmehr wird vermutet, dass es in die Erkennung der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr involviert ist. Obwohl diese, wie inzwischen bekannt ist, im Eubakterium Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr darstellt (Nita-Lazar *et al.*, 2005), könnte das Aspartat in WWDYG daran beteiligt sein, erzeugt die Mutation doch einen letalen Phänotyp (siehe Diplomarbeit, 2003). Möglicherweise fungiert dieser Aminosäurerest als Brønsted Base und deprotoniert, analog dem Modell von GnTI, den Akzeptor Asparagin, um den nucleophilen Angriff auf das C1-Atom von GlcNAc des Donors DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ zu erleichtern .

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Aspartatrest in den Motiven $_{516}\text{WWDYG}_{520}$ und $_{534}\text{DNNT}_{537}$ für die Aktivität der OST *in vitro* und *in vivo* essentiell ist. Ebenso verhält es sich für die jeweils erste negativ geladene Aminosäure in den Sequons $_{494}\text{DDF}_{496}$ und $_{565}\text{DVD}_{567}$. Die Letalität beider Mutationen in $_{582}\text{DDI}_{584}$ macht dieses Motiv zu einem „heissen“ Kandidaten für die Koordination von Mn²⁺ und Sitz im aktiven Zentrum. Analysen der CPY sowie OST-Aktivität belegen, dass die mutierten Stt3-Proteine exprimiert und in den Komplex eingebaut werden. Da die Unterglykosylierung der CPY in den nicht-komplementierenden Mutanten stärker ausgeprägt ist als im Hintergrundstamm *stt3-7* (Abb. 9), und auch die gemessene OST-Aktivität deutlich reduziert ist (Tab. 3), kann gefolgert werden, dass die mutierten Stt3-Proteine das von *stt3-7* codierte Allel verdrängen und einen nichtfunktionellen OST-Komplex erzeugen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Aminosäureaustausche Proteine zur Folge haben, welche die Assemblierung des Komplexes beeinträchtigen.

2.2 Untersuchungen zum Stt3-Homolog PglB aus *Campylobacter jejuni*

2.2.1 Klonierung von *PGLB* aus NCTC11168

Die Entdeckung des Pgl-Genclusters aus *Campylobacter jejuni* im Jahre 2002 widerlegte die bisherigen Vermutungen, bei N-Glykosylierung handele es sich um eine auf Eukaryoten sowie Archaeabakterien beschränkte Modifikation. Durch Rekonstitution des gesamten *Clusters* in *E. coli* konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Glykosylierungsmaschinerie auch in Fremdorganismen eine N-Glykosylierung katalysiert (Wacker *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass das Operon nur ein Stt3-Homolog enthält und sämtliche andere Komponenten des OST-Komplexes fehlen, war ein klarer Hinweis, dass Stt3 die katalytische Untereinheit des Komplexes darstellt. Auch die Konservierung des bereits in 1.3 erwähnten WWDYG-Motivs in der C-terminalen Domäne spricht für diese Vermutung. Da für das 713 Aminosäuren lange Polypeptid eine Topologie mit 10-12 TMspannen analog dem aus Hefe vorhergesagt wird, stellte sich die Frage, ob das eubakterielle Homolog PglB in Hefe funktionell ist und eine Stt3-Defizienz in *S. cerevisiae* komplementieren kann. Auch trotz geringer Homologie zwischen Stt3 aus Hefe und *C. jejuni* (~ 11 % Identität) könnte eine strukturelle Konservierung vorliegen, die dem eubakteriellen PglB in Hefe Aktivität ermöglicht.

Bei *Campylobacter jejuni* handelt es sich um ein pathogenes Bakterium, dessen Handhabung S2-Labore benötigt. Um das Gen *PGLB* klonieren zu können, wurde uns genomische DNA vom Klinikum Göttingen zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um DNA des Stamms NCTC11168, dessen Sequenz über Datenbanken zugänglich ist. Dieser Stamm wurde auch von Wacker *et al.* zur Rekonstitution in *E. coli* verwendet (Wacker *et al.*, 2002). Zunächst sollte das Gen über PCR amplifiziert und in einen Subklonierungsvektor zwischenkloniert werden. Anschließend sollte die Klonierung in den Hefe-*Shuttle*-Vektor pVT100-ZZ erfolgen, wodurch ein Protein A-Epitop an das C-terminale Ende von PglB fusioniert wird. Die Amplifikation des Gens stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus. Nur bei Verwendung der *Taq DNA Polymerase* von Qiagen konnte ein Produkt erzielt werden, welches in den Vektor pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen) gebracht wurde. Auch hier konnten nur vier positive Klonen identifiziert werden, deren Sequenzierung z.T. enorme Abweichungen zur Sequenz des in der Datenbank abgelegten *PGLB* aus NCTC11168 ergab. Da zunächst davon ausgegangen wurde, dass es sich um bei der PCR entstandene Fehler handelt, wurde erneut genomische DNA von NCTC11168 bezogen, diesmal jedoch vom Klinikum Marburg. Mit diesem Isolat war nur die Amplifikation mit der *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) er-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

folgreich; das PCR-Produkt wurde in diesem Fall in den Vektor pDrive (Qiagen) kloniert. Wie die Sequenzierung des einzigen positiven Klons zeigte, enthielt das amplifizierte Gen erstaunlicherweise dieselben Mutationen wie ein Klon der ersten Isolierung. Neben zahlreichen Basenaustauschen, die jedoch zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führten, wurden auch Mutationen identifiziert, welche teilweise gravierende nichtkonservative Austausche bewirkten. Abb. 13 zeigt das Ergebnis des Proteininsequenzalignment des klonierten *PGLB* mit der veröffentlichten Sequenz von PglB-Polypeptiden unterschiedlicher *C. jejuni* Stämme. Das Alignment zeigt, dass im Vergleich zum Stamm NCTC11168 25 Basenaustausche vorliegen. Da in zwei Klonen unterschiedlicher Amplifikationen exakt dieselben Mutationen vorlagen, wurde gefolgert, dass es sich hierbei um Gendiversität handeln muss. Für das pathogene Eubakterium wurde dieses Phänomen bereits intensiv studiert und die Untersuchungen zeigten, dass die stammabhängigen Sequenzunterschiede weit verbreitet sind und den jeweiligen Stämmen unterschiedliches pathogenes Potential verleihen. Darüber hinaus ist eine Variabilität auch innerhalb eines Stammes zu beobachten (Dorrell *et al.*, 2001). Offenbar handelt es sich bei den klonierten Varianten von PglB um eine solche Diversität, die jedoch zu einem aktiven Protein führt. Das Alignment zeigt, dass im Vergleich zu den anderen Sequenzen drei Aminosäureaustausche in dem durch PCR generierten PglB enthalten sind, welche sich möglicherweise negativ auf die Struktur bzw. Aktivität des Proteins auswirken könnten. Daher wurde zunächst das „Wildtyp“-Gen in den Vektor pVT100-ZZ kloniert. Das Genprodukt wird als *C.j.PglB^{ZZ}* bezeichnet. In diesem Konstrukt wurden anschließend durch zielgerichtete Mutagenese die in Abb. 13 rot eingerahmten Aminosäuren an die in allen Stämmen konservierten Aminosäuren angeglichen (Tab. 5).

ERGEBNISSE und DISKUSSION

PGLB d.Arbei	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
D540, HS19	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
81116	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
81-176	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
RM1221	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
D540, HS39	MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVCRFYWWWASEFNEYFFNNQQLMIIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGS	80
PGLB d.Arbei	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
D540, HS19	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
81116	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
81-176	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
RM1221	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
D540, HS39	SLSALTYWLKYKTPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPLMGFVAALLASANSYYNRITMSGYYDTDMLVIVL	160
PGLB d.Arbei	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
D540, HS19	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
81116	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
81-176	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
RM1221	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
D540, HS39	PMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWWWPSSYTLNVALIGLFIYTILIFHRKEKIFYIAVLSSLTLSNIAWFY	240
PGLB d.Arbei	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANIMQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
D540, HS19	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANITQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
81116	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANITQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
81-176	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANITQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
RM1221	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANITQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
D540, HS39	QSAIIVILFALFALEQKRINEMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIIFRSDESANITQGFMYFNVNQTIQEVENV	320
PGLB d.Arbei	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
D540, HS19	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
81116	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
81-176	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
RM1221	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
D540, HS39	DLISEFMMRISGSEIVFLSLFGEWLLRKHKSIMAIIPILVLGFLALKGGRLRTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIILVKKY	400
PGLB d.Arbei	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
D540, HS19	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
81116	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
81-176	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
RM1221	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
D540, HS39	SQLTSNCIVFATILTLPVFIHYIYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANRIMYVVTWWWDYGYFVRYYSDVKTLVDGGKHL	480
PGLB d.Arbei	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
D540, HS19	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYALQNDILKTCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
81116	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
81-176	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
RM1221	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKSCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
D540, HS39	GKDNNFFPSFALSKDQAAANMARLSVEYTEKSFYALQNDILKTCILQAMMKDYNQSNVFLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI	560
PGLB d.Arbei	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
D540, HS19	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
81116	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
81-176	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
RM1221	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
D540, HS39	YLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEYIYLSNGVVISDDFRSKIGDNVVSVNSIVEINSI	640
PGLB d.Arbei	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713
D540, HS19	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713
81116	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713
81-176	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713
RM1221	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713
D540, HS39	KQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYLKNLFDSVINSRDAKVFKLKI	713

Abb. 13: Proteinsequenzalignment des klonierten *PGLB* aus NCTC11168 mit Sequenzen von *PglB* aus verschiedenen *Campylobacter jejuni* Stämmen. Die *PglB*-Sequenzen unterschiedlicher *C. jejuni* Stämme entstammen der NCBI-Datenbank. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Aminosäureaustausche sind rot eingeklammert.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

ausgetauschte Aminosäuren in <i>C.j.PglB</i>^{ZZ}
C425Y
V451E
R496Q

Tab. 5: Zielgerichtete Mutagenese in *C.j.PglB*^{ZZ}. Über PCR wurden in das in den Vektor pVT100-ZZ klonierte *PGLB* die angegebenen Aminosäuren eingeführt.

Die resultierenden Konstrukte einschließlich der Ausgangsform wurden folgend im Stamm *stt3-7* analysiert.

2.2.2 **PglB kann die Unterglykosylierung des temperatursensitiven Stammes *stt3-7* nicht revertieren**

Nachfolgend sollte nun der Einfluss des eubakterischen Homologen auf die N-Glykosylierung in dem Stamm *stt3-7* untersucht werden. Analog den Versuchen mit *S.c.Stt3*-Mutanten in 2.1, sollte die Überexpression von PglB bei Komplementation eine vollständige bzw. bessere Glykosylierung des Modellproteins CPY aufweisen. Voraussetzung hierfür wäre, dass das Protein aus *C. jejuni* entweder in den Komplex eingebaut wird und katalytisch aktiv ist. Alternativ könnte man sich vorstellen, dass das Polypeptid monomer in der ER-Membran verankert ist, und als solches selbst die Katalyse vermittelt, ähnlich der Situation in *C. jejuni*. Um den Status der CPY überprüfen, wurden Extrakte von bei 25°C angezogenen Zellen über Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

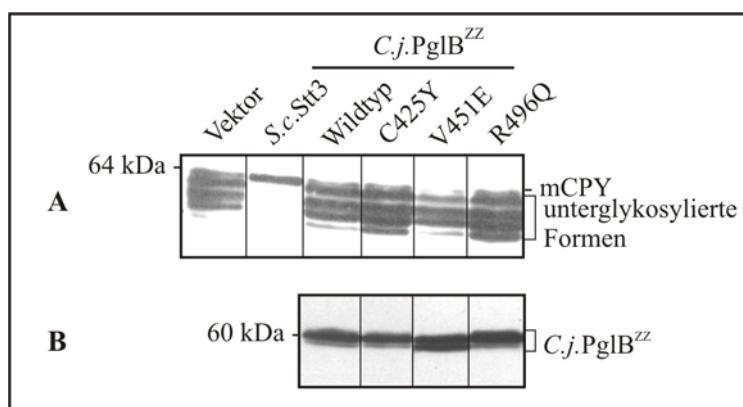


Abb. 14: Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY im Stamm *stt3-7* mit *C.j.PglB*^{ZZ} sowie den Mutanten C425Y, V451E und R496Q mit jeweiliger Expressionskontrolle. Die jeweiligen Zellen wurden bei 25°C in Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen, Membranen/Cytosol präpariert und über *Western Blot* analysiert. Die im Cytosol befindliche CPY wurde durch Dekoration mit anti-CPY Antikörper detektiert (A), die Membranfraktion auf Expression der jeweiligen PglB-Polypeptide mit anti-*mouse IgG* (B). Als Positivkontrolle wurde Extrakt mit plasmidcodiertem Wildtyp *S.c.Stt3* in *stt3-7* aufgetragen.

Wie aus Abb. 14 A ersichtlich, kann das Vollängenprotein *C.j.PglB*^{ZZ} den Unterglykosylierungsphänotyp des Stammes *stt3-7* nicht supprimieren. Die CPY zeigt deutlich dieselben Ban-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

den der ein- bis vierfach unterglykosylierten Form wie in der Kontrolle mit Leerplasmid. Gleiches ist für die Einzelmutanten C425A, V451E und R496Q zu beobachten, keine der hier ausgetauschten Aminosäuren erzeugte ein funktionelles PglB. Einzig in der Spur mit Cytosol-extrakt von Wildtyp SS328 ist die mature, vierfach glykosyierte CPY zu detektieren. Analysen der Membranfraktion zeigen, dass sowohl das ursprüngliche, als auch die durch Mutation angeglichenen *C.j.PglB^{ZZ}* Varianten exprimiert werden (Abb. 14 B). Auffallend jedoch ist, dass PglB in zwei Formen zu existieren scheint. Neben einer prominenten Bande bei ca. 60 kDa ist auch ein schwächeres, im Falle von V451E ein etwas deutlicheres Signal bei ca. 58 kDa zu detektieren. Wie sich später herausstellte, handelt es sich hierbei um unterschiedlich glykosyierte Formen des eubakteriellen PglB, worauf in 2.2.4 näher eingegangen wird. Fakt jedoch ist, dass das Stt3-Homolog PglB aus *C. jejuni* in Hefe nicht funktionell ist, obgleich es aufgrund des Signals in der *Western Blot* Analyse gut exprimiert zu werden scheint. Nachdem die Einzelmutanten keine Komplementation des *stt3-7* Phänotyps zeigten, wurde eine Triplemutante C425Y_V451E_R496Q erstellt, in welcher alle drei in Tab. 5 genannten Aminosäuren gezielt ausgetauscht wurden. Doch auch hier konnte kein positiver Einfluss auf die katalytische Aktivität von *C.j.PglB^{ZZ}* verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn kein positives Ergebnis zu erwarten war, wurde das unmutierte Gen *C.j.PGLB* als auch die Triplemutante C425Y_V451E_R496Q im Vektor pVT100-ZZ in den diploiden Stamm *STT3/Δstt3* transformiert und nachfolgend die Tetradensegregation überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

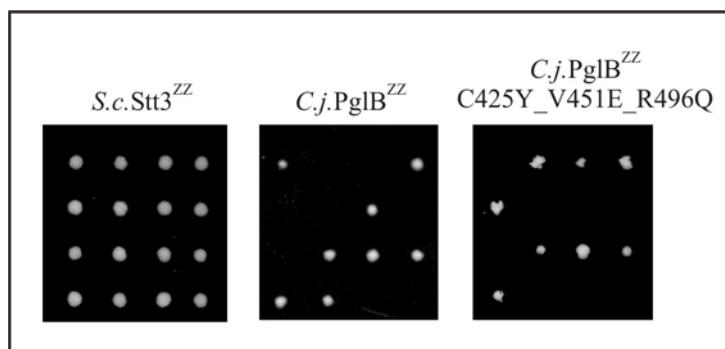


Abb. 15: Tetradenanalyse von *S.c.Stt3^{ZZ}*, *C.j.PglB^{ZZ}* und Triplemutante *C.j.PglB^{ZZ} C425Y_V451E_R496Q* im Vektor pVT100-ZZ in *STT3/Δstt3*. Die Tetraden wurden auf Sporulationsmedium ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 25°C inkubiert. Von den sporulierten Zellen wurden einige abgenommen und für 15 min die Zellwand mit Zymolyase angedaut. Hiervon wurden die einzelnen Tetraden gepickt, vereinzelt, auf Vollmedium abgelegt und für 2 Tage bei 25°C inkubiert.

Wie zu erwarten, kann weder das Ausgangsprotein *C.j.PglB^{ZZ}* noch die Triplemutante das fehlende *S.c.Stt3* ersetzen. Zeigen die vereinzelten Tetraden des mit *S.c.Stt3^{ZZ}* transformierten Stammes *STT3/Δstt3* 4:0 Wachstum, spricht die 2:2 Segregation mit *C.j.PglB^{ZZ}* und der Mu-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

tante dafür, dass ein Einbau des eubakteriellen Homologs in den Komplex bei Abwesenheit von *S.c.*Stt3 zu Letalität führt. Daher stammt die in Abb. 14 beobachtete Unterglykosylierung aus Einbau des funktionell beeinträchtigten *S.c.*Stt3 in *stt3-7*.

2.2.3 Untersuchungen der OST-Aktivität in Abhängigkeit von PglB

Aus obigen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Stt3-Homolog aus *C. jejuni* die Funktion von *S.c.*Stt3 zumindest *in vivo* nicht übernehmen kann. Die Tetradenanalyse belegt deutlich, dass *C.j.*PglB anstelle des Hefe-Homologs in Zellen nicht ausreicht, um das Wachstum zu ermöglichen. Dazu wäre notwendig, dass es in den Komplex inkorporiert wird und so die vollständige und ebenso präzise N-Glykosylierung analog einer OST mit *S.c.*Stt3 durchführt. Möglicherweise jedoch liegt das bakterielle Stt3 als einzelnes Protein in der Membran vor und transferiert hier mit veränderter Spezifität, evtl. auch zufällig Oligosaccharide auf Sequons einiger Glykoproteine. Diese Aktivität könnte zu gering sein, um den Stoffwechsel der Bäckerhefe in „Schwung“ zu halten. Ebenso könnte die CPY kein Akzeptorprotein für *C.j.*PglB darstellen, weshalb die Untersuchungen in *stt3-7* keine Komplementation zeigten (Abb. 14 A). Um all diese Probleme zu umgehen, wurden Membranen von *C.j.*PglB^{ZZ} und der Triplemutante C425Y_V451E_R496Q in *stt3-7* isoliert und in einem *in vitro* OST-Aktivitätstest eingesetzt. Besitzt PglB nur geringe Aktivität, sollte man sie in diesem sensitiven Test erfassen können. Zu Beginn der Untersuchungen war nicht bekannt, dass die bakterielle im Gegensatz zu der eukaryotischen OST ein anderes Akzeptorsequon zur Erkennung benötigt. Neben dem Asn-X-Ser/Thr Motiv benötigt PglB an Position -2 relativ zum Aspartat eine saure Aminosäure wie Aspartat oder Glutamat, wodurch sich das Sequon auf Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr verlängert (Kowarik *et al.*, 2006b). Dies zeigte zum einen, dass die CPY tatsächlich kein Substrat für PglB darstellt, da sich vor keiner der vier Glykosylierungsstellen eine saure Aminosäure an -2 befindet, zum anderen musste der *in vitro* Test mit modifizierten Akzeptorpeptiden durchgeführt werden. Das standardgemäß eingesetzte Hexapeptid YNSTSV wurde durch verschiedene aspartathaltige Analoga mit den jeweiligen Negativkontrollen ersetzt. Sämtliche verwendeten synthetische Peptide sind in Tab. 6 zusammengefasst.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Einsatz als	Firma
YNSTSV	Standard Hexapeptid für OST
GDYNSTSV	Sigma Genosys
GAYNSTSV	Sigma Genosys
ASKDFNRSKAL	erweitertes Oktapeptid, Aspartat an -2
ASKAFNRSKAL	erweitertes Oktapeptid, Alanin an -2, Negativkontrolle
ASKAFNRSTAL	Teilsequenz des <i>in vivo</i> Substrats AcrA von <i>C. j. PglB</i>
ASKAFNRSTAL	Negativkontrolle des AcrA-Peptids mit Alanin an -2
ASKAFNRSTAL	K ₉ ausgetauscht mit T, höhere Glykosylierungswahrscheinlichkeit
	Sigma Genosys
	Eurogentec, Seraing
	Eurogentec, Seraing
	Sigma Genosys

Tab. 6: In den *in vitro* OST-Aktivitätstest eingesetzte synthetische Peptide mit *C.j.PglB*^{ZZ} sowie der Triplemutante C425Y_V451E_R496Q. Die Peptide wurden synthetisch hergestellt und bei den angegebenen Firmen bezogen. Die Akzeptorsequons sowie die Aminosäure an Position -2 sind fett gedruckt.

Das Hexapeptid YNSTSV, ein guter Akzeptor für die OST, wurde auf das Oktapeptid **GDYNSTSV** erweitert, welches die negativ geladene Aminosäure Aspartat an -2 enthält. Als Negativkontrolle wurde selbiges, jedoch mit neutralem Alanin an -2 synthetisiert. Darüber hinaus wurde ein Peptid verwendet, dessen Sequenz von einem *in vivo* Substrat von *C. jejuni* abgeleitet wurde: Das Protein AcrA ist ein Glykoprotein, das bei Untersuchungen der N-Glykosylierung des Pgl-Genclusters als Akzeptor identifiziert wurde (Wacker *et al.*, 2002). Anhand dieses Proteins wurde auch gezeigt, dass *C.j.PglB* eine negativ geladene Aminosäure an Position -2 zur Erkennung benötigt. Mittels verkürzter Formen von AcrA wurde eine zur Modifikation nötige Minimalstruktur identifiziert, welche Modell für das gewählte synthetische Peptid ASKDFNRSKAL stand (Kowarik *et al.*, 2006b). Wie aus Untersuchungen der Akzeptoreigenschaften um das Asn-X-Ser Motiv bekannt ist, ist die Transferrate mit Threonin an +1 im Vergleich zu Lysin etwa doppelt so hoch (Mellquist *et al.*, 1998). Daher wurde auch eine modifizierte Version der Sequenz ASKDFNRSTAL eingesetzt. Da das Stt3-Homolog aus *Campylobacter jejuni* breite Substratspezifität besitzt, wurde Chitobiose DolPP-GlcNAc₂ als Oligosacchariddonor verwendet. Die Ergebnisse des Tests sind in Tab. 7 dargestellt.

	YNSTSV	GDYNSTSV	GAYNSTSV	ASKDFNRS KAL	ASKAFNRS KAL	ASKDFNRS TAL
WT SS328	100 %	214 %	241 %	8 %	13 %	41 %
<i>stt3-7</i> Vektor	28 %	48 %	59 %	8 %	7 %	9 %
<i>stt3-7 C.j.PglB</i>^{ZZ}	27 %	-	-	-	-	-
<i>stt3-7 C.j.PglB</i>^{ZZ} C425Y_V451E_ R496Q	27 %	47 %	57 %	8 %	6 %	10 %

Tab. 7: Ergebnisse des *in vitro* OST-Aktivitätstests mit unterschiedlichen Akzeptorpeptiden. Die Kulturen wurden in Selektivmedium bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ 2-4 angezogen und davon Membranen präpariert. Je 100 µg Rohmembranen wurden in den Test mit Chitobiose sowie 2.5 mM des jeweiligen synthetischen Peptids eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 24°C für 10 min. In den Peptiden sind die Akzeptorsequons sowie die Aminosäure an Position -2 fett gedruckt. Die Transferrate von Wildtyp SS328 mit dem herkömmlichen Hexapeptid YNSTSV wurde gleich 100 % gesetzt, alle anderen Werte darauf bezogen. Nicht durchgeföhrte Reaktionen sind mit "-" dargestellt.

Ein Vergleich der Aktivitäten mit Membranen des Wildtyps SS328 zeigt deutlich, dass die einzelnen Akzeptorpeptide mit unterschiedlicher Effizienz vom Hefe OST-Komplex modifi-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

ziert werden. So stellen die langen, vom Protein AcrA abgeleiteten Peptide ASKDFNRSKAL und seine Negativkontrolle ASKAFNRSKAL sehr schlechte Substrate dar, die Transferrate sinkt von 100 % mit dem herkömmlich eingesetzten Peptid YNSTSV auf 8 und 13 %. Wurde das Lysin an +1 gegen ein Threonin ausgetauscht (ASKDFNRSTAL), waren immerhin 41 % zu verzeichnen. Wurde der N-Terminus von YNSTSV auf GAYNSTSV expandiert, findet man eine mehr als verdoppelte Transferrate. Ähnliches ist für das Pendant GDYNNTSV zu beobachten, wobei das Peptid mit D anstelle von A an Position -2 mit 25 % geringerer Aktivität übertragen wird. Dieselbe Tendenz zeichnet sich bei Vergleich von ASKDFNRSKAL und ASKAFNRSKAL ab: Alanin an Position -2 scheint vom OST-Komplex der Hefe favorisiert zu sein. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen der Region um das Akzeptorsequon, welche zeigten, dass Aspartat oder Glutamat an -2 und -1 nicht, aromatische Aminosäuren hingegen bevorzugt werden (Ben-Dor *et al.*, 2004). Aufgrund der Punktmutation in Stt3 betragen die Raten von *stt3-7* mit Leervektor nur etwa 20 % der Aktivität des Wildtyps mit dem jeweiligen Peptid. Eine parallele Expression von *C.j.PglB^{ZZ}* und auch der Triplemutante C425Y_V451E_R496Q in *stt3-7* konnte keine Steigerung der Aktivität bewirken, die Transferraten lagen im gleichen Rahmen wie die des Kontrollstamms mit leerem Plasmid. Um auszuschließen, dass trotz der breiten Substratspezifität von PglB die Verwendung von DolPP-GlcNAc₂ im OST-Test der Grund für die Nichtaktivität von PglB ist, wurden die Test mit GDYNNTSV, ASKDFNRSKAL und ASKDFNRSTAL auch mit dem für Eukaryoten optimalen Substrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ wiederholt. Doch auch hier zeigte die Expression von *C.j.PglB^{ZZ}* keine Steigerung der OST-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde das Stt3-Homolog aus *Campylobacter jejuni* im Wildtypstamm SS328 exprimiert. Wie in 2.2.4 näher erläutert, ist PglB zumindest bei Expression in *S. cerevisiae* glykosyliert. Da nicht bekannt ist, ob dies auch in *C. jejuni* der Fall ist, sollte vermieden werden, dass eine Unterglykosylierung von PglB in *stt3-7* zu einem Funktionsverlust des Proteins führt, zumal für Stt3 aus Hefe bekannt ist, dass die Glykosylierung im C-Terminus für die Aktivität unabdingbar ist (Li *et al.*, 2005). Doch auch die Expression der PglB Triplemutante in SS328 zeigte, dass Rohmembranen dieser Präparation keine Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Wildtyp aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Somit muss gefolgert werden, dass das Stt3-Homolog PglB aus *Campylobacter jejuni* den Phänotyp von *stt3-7* nicht komplementieren kann. Weder *in vivo* Untersuchungen des Glycoproteins CPY (Abb. 14 A), noch Messung der OST-Aktivität *in vitro* weisen eine Glykosylierungsaktivität nach. Auch die Angleichung der Sequenz des isolierten *PGLB*-Gens an die kon-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

servierten Aminosäuren verschiedener *C. jejuni* Stämme zur C425Y_V451E_R496Q Triple-mutante zeigte keinen Effekt. Somit scheinen diese Aminosäuren nicht essentiell für die Aktivität von PglB zu sein, zumindest bei Expression in *S. cerevisiae*. Nach Veröffentlichung des verängerten Sequons Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr schien es plausibel, dass das Homolog nicht den ganzen Glykosylierungsstatus in Hefe aufrechterhalten kann (Kowarik *et al.*, 2006b), da bereits das erste analysierte Glykoprotein CPY kein Asp oder Glu an -2 enthält. Nachdem im Aktivitätstest auch optimierte Akzeptorpeptide mit saurer Aminosäure an Position -2 eingesetzt wurden, kann nur spekuliert werden, weshalb das Homolog in Hefe nicht aktiv ist. Für eine Reihe von O-Antigenen konnte gezeigt werden, dass PglB Glykane unterschiedlichster Zusammensetzung mit breiter Spezifität überträgt (Feldman *et al.*, 2005), sofern eine Acetamido-Gruppe am C2 des Oligosaccharids vorhanden ist (Glover *et al.*, 2005b). Die Tatsache, dass diese Gruppe auch im Substrat DolPP-GlcNAc₂ des Aktivitätstests präsent ist ließ vermuten, dass PglB den Membrananker Dolichol nicht erkennt. Wie eine jüngste Veröffentlichung zeigt, scheint PglB tatsächlich Spezifität für Polyisoprenol-gebundene Oligosaccharide zu besitzen (Chen *et al.*, 2007). *In vitro* Tests ergaben, dass das Stt3-Homolog aus *C. jejuni* Glykane, welche an α -gesättigte Polyprenole wie Dolichol geknüpft sind, nur sehr schlecht als Substrat erkennt. Folglich scheint es wahrscheinlich, dass der Membrananker Dolichol des Substrats DolPP-GlcNAc₂ der Grund für die Inaktivität von PglB im Aktivitätstest ist.

2.2.4 PglB wird bei Expression in *S. cerevisiae* an zwei von drei möglichen Stellen glykosyliert

Wie in Abb. 14 B zu sehen, zeigte das Signal des Proteins *C.j.PglB*^{ZZ} im *Western Blot* zwei Banden, was zu der Spekulation veranlasste, dass PglB in *S. cerevisiae* selbst N-glykosyliert wird. Die Analyse der Sequenz von PglB ergab drei potentielle Glykosylierungsstellen, die in Tab. 8 angegeben sind.

potentielle Glykosylierungsstellen in PglB
YY ₁₄₄ NRT
NV ₃₁₁ NQT
DY ₅₃₃ NQS

Tab. 8: Angabe der möglichen Glykosylierungsstellen in *C.j.PglB*.

Um einen ersten Anhaltspunkt zu gewinnen, ob zumindest eines dieser Akzeptorsequons bei Expression in *S. cerevisiae* modifiziert wird, wurden Membranen von *C.j.PglB*^{ZZ} C425Y_V451E_R496Q in *stt3-7* und SS328 isoliert und nach einem Verdau mit Endoglykosidase H

ERGEBNISSE und DISKUSSION

(Endo H) über *Western Blot* analysiert. Dieses Enzym spaltet spezifisch zwischen den beiden proximalen N-Acetylglukosaminresten von N-Glykanen des *high-mannose*-Typs. Als Kontrolle wurden Membranen des Wildtyps mit *S.c.**Stt3^{ZZ}* analog behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

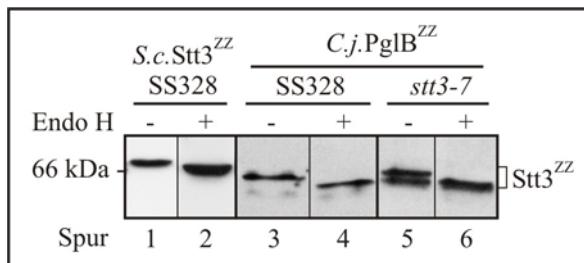


Abb. 16: Analyse des Glykosylierungsstatus von *S.c.Stt3^{ZZ}* und *C.j.**PglB^{ZZ}* in SS328 bzw. *stt3-7* nach Endo H-Verdau.** Rohmembranen wurden nach Denaturierung mit 0.5 % SDS und EtSH bei 45°C +/- Endo H für 4 h bei 37°C inkubiert und Aliquots über *Western Blot* analysiert. Die Detektion der Protein A-markierten Polypeptide erfolgte durch Dekoration mit anti-*mouse* IgG.

Wie für Stt3 aus Hefe bekannt, ist dieses an Position N₅₃₉NT glykosyliert (Li *et al.*, 2005). Auch die Analyse in Abb. 16 bestätigt, dass durch Zugabe von Endo H ein *Shift* im Laufverhalten zu sehen ist, was zeigt, dass *S.c.**Stt3^{ZZ}* in SS328 glykosyliert wird (vgl. Spur 1 und 2). Die beobachtete Dublette des Signals von *C.j.**PglB^{ZZ}* in *stt3-7* ohne Endo H resultiert tatsächlich aus der Glykosylierung des Proteins (Spur 5); nach Verdau mit Endo H findet man nur noch die schneller wandernde Bande des Doppelsignals, was der unglykosylierten Form entspricht (Spur 6). Exprimiert man PglB in einem Wildtyp, so findet man dominant nur die obere Bande von PglB in *stt3-7*, was die vollständig modifizierte Version repräsentiert (Spur 3). Der Verdau durch Endo H wiederum zeigt nur die untere, nackte Form von *C.j.**PglB^{ZZ}* (Spur 4). Somit ist eindeutig gezeigt, dass die Dublette in *stt3-7* eine Folge der Unterglykosylierung von PglB in diesem Stamm ist, oder anders ausgedrückt, dass PglB in *S. cerevisiae* glykosyliert wird.

Da PglB drei potentielle Glykosylierungsstellen besitzt (Tab. 8), sollte erkundet werden, welche dieser *Sites* tatsächlich besetzt ist. Hierzu wurden zielgerichtet Mutationen eingeführt, wodurch die Akzeptorsequons Asn-X-Ser/Thr nicht mehr als solche von der Hefe-OST zu erkennen waren.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Mutation	betroffenes Sequon
T146A	YY ₁₄₄ NRT
T313A	NV ₃₁₁ NQT
S535I	DY ₅₃₄ NQS
T146A_T313A	YY ₁₄₄ NRT; NV ₃₁₁ NQT
T146A_S535I	YY ₁₄₄ NRT; DY ₅₃₃ NQS
T313A_S535I	NV ₃₁₁ NQT; DY ₅₃₃ NQS
T146A_T313A_S535I	alle drei

Tab. 9: Zielgerichtete Mutagenesen einzelner Aminosäuren der potentiellen Akzeptorsequons von *C.j.PglB*^{ZZ}. Als Ziel der Mutationen diente das Gen *C.j.PGLB* im Vektor pVT100-ZZ, welches bereits durch dreimalige Mutagenese von C425Y_V451E_R496Q an die Wildtypsequenz von PglB aus NCTC11168 angeglichen wurde. Obgleich es sich um die Triplemutante handelt, wurde das entsprechend exprimierte Protein als "Wildtyp" *C.j.PglB*^{ZZ} bezeichnet.

Das Vergleichen der Bandenmuster von *C.j.PglB*^{ZZ} bei Expression in SS328 sollte Aufschluss über die *in vivo* besetzten Akzeptorstellen geben. Die Ergebnisse der *Western Blot* Analyse sind in Abb. 17 dargestellt.

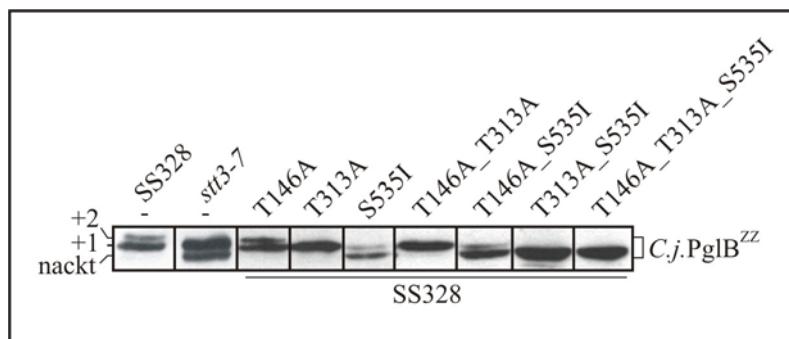


Abb. 17: Analyse des Glykosylierungsstatus von *C.j.PglB*^{ZZ} mit den jeweiligen Mutationen im Akzeptorsequon im Stamm SS328. Die Transformanten (Vektor pVT100-ZZ) wurden bei 25°C in Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ 2-4 angezogen und davon Membranen präpariert. Die Analyse erfolgte über *Western Blot* durch Dekoration mit anti-*mouse* IgG. "-" bezeichnet das in Akzeptorsequons unmutierte „Wildtyp“ *C.j.PglB*^{ZZ}.

Der Phänotyp von *C.j.PglB*^{ZZ} in *stt3-7* ohne Mutation ("") wurde bereits durch den Endo H-Verdau erklärt (Abb. 16): bei der unteren Bande handelt es sich um die unglykosyierte Form von PglB, die auch als nackte Form bezeichnet wird. Die prominente obere Bande stellt die einfach modifizierte Version dar, als +1 tituliert. Die Expression desselben Proteins in SS328 ("") zeigt überwiegend die +1-Form, daneben auch eine schwächere Bande höheren Molekulargewichts. In der ersten Mutante T146A, in welcher das Threonin von YYN₁₄₄RT nach Alanin mutiert ist, findet man den Phänotyp von "- SS328", somit scheint dieses Sequon nicht besetzt zu sein. Ist T313A in NVN₃₁₁QT ausgetauscht, findet man nur die prominente Bande des Signals in Wildtyp SS328, ein Indiz, dass es sich bei der schwächeren, höher molekularen Bande ("- SS328") um das auch an N₃₁₁QT modifizierte PglB handelt. Somit repräsentiert die prominente Bande von SS328 als auch von *stt3-7* die einfach glykosyierte Form des Motivs DYN₅₃₃QS. Wie die Doppelmutanten von T313A und S535I mit T146A belegen, wird

ERGEBNISSE und DISKUSSION

$N_{144}RT$ tatsächlich nicht besetzt: es ist jeweils der Phänotyp der Einzelmutante T313A bzw. S535I zu beobachten. Ist nur S535I in $N_{533}QS$ mutiert, findet man überwiegend die nackte Form von PglB. Die schwächere Bande von +1 muss somit aus der Glykosylierung von $N_{311}QT$ resultieren, die auch für die Steigerung der +1 auf die +2-Form in "- SS328" verantwortlich ist. Auch die Doppelmutante T311A_S535I belegt, dass die Besetzung beider Sequons für die +2-Form verantwortlich ist, da hier nur die nackte Form gefunden wurde. Selbiges ist für die Triplemutante zu beobachten. Somit ist zu folgern, dass $C.j.PglB^{ZZ}$ hauptsächlich an $N_{533}QS$ glykosyliert ist, zu einem geringeren Anteil an $N_{311}QT$. Das Sequon $N_{144}RT$ wird überhaupt nicht besetzt, was nicht weiter erstaunlich ist, da sich dieses Motiv in einer postulierten Transmembranspanne befindet. Nachdem für Gründe gesucht wurde, weshalb PglB in Hefe nicht funktionell ist, wäre eine mögliche Erklärung, dass das Protein in Hefe anders glykosyliert ist, als in *C. jejuni*. Da bekannt ist, dass *C.j.PglB* nur D/E-X-N-R-S/T erkennt, kann das Protein im Eubakterium weder an $YYN_{144}RT$, noch an $NVN_{311}QT$ glykosyliert sein. Einzig die in *S. cerevisiae* dominant besetzte Site $DYN_{533}QS$ könnte auch in *C. jejuni* modifiziert sein. Da aber der Status in *C. jejuni* nicht bewiesen ist, könnte diese Modifikation im Falle der Expression in Hefe ein störender Faktor sein. Diese Spekulationen könnten sich vor allem auf den Fall beziehen, wenn PglB als Monomer in der ER-Membran residiert, wo es zur Katalyse den nativen Zustand wie in *C. jejuni* benötigt. Eine 2005 veröffentlichte Arbeit gibt jedoch Anlass zur Vermutung, dass PglB selbst nicht glykosyliert sein muss, um katalytisch aktiv zu sein. Glover *et al.* setzten heterolog in *E. coli* exprimiertes PglB in einen *in vitro* Test ein, in welchem die katalytische Aktivität bestätigt wurde (Glover *et al.*, 2005b). Da *E. coli* selbst keine N-Glykosylierung durchführen kann, war das Protein folglich unmodifiziert katalytisch aktiv. Ob auch modifiziertes PglB aktiv ist, und ob PglB auch in *C. jejuni* glykosyliert ist, bleibt nachzuweisen.

Geht man im zweiten Fall davon aus, dass PglB in den Komplex integriert ist, scheint vor allem die Konformation des C-Terminus bedeutend zu sein. Sollte der Glykosylierungsstatus von PglB eine von *S.c.Stt3* abweichende Struktur bedingen, ist keine katalytische Aktivität möglich.

Bleibt zu erwähnen, dass alle in Abb. 17 untersuchten Mutanten auch im Stamm *stt3-7* analysiert wurden, keine der Varianten von $C.j.PglB^{ZZ}$ jedoch Komplementation der Unterglykosylierung der CPY zeigte (Daten nicht gezeigt).

2.2.5 Optimierung der Akzeptorsequenz in der C-terminalen Domäne von PglB

Wie bereits erwähnt, ist die Glykosylierung von *S.c.*Stt3 an N₅₃₉NT für die Katalyse der Hefe-OST essentiell. Da sich dieses Akzeptorsequon 14 Aminosäuren nach dem konservierten Motiv WWDYG₅₂₀ in der C-terminalen, luminalen Domäne von Stt3 befindet (Abb. 7), könnte man postulieren, dass eine Interaktion von WWDYG mit dem Glykan an N₅₃₉NT für die Ausbildung einer Tertiärstruktur verantwortlich sein könnte, welche wiederum für die Aktivität notwendig ist. Weiterhin könnte eine Glykosylierung auch eine wichtige Voraussetzung für die Inkorporation in den Komplex darstellen. Damit ließe sich erklären, weshalb PglB das *S.c.*Stt3 innerhalb des Komplexes nicht ersetzen kann. Im eubakteriellen Stt3 befindet sich WWDYG₄₆₁ 72 Aminosäuren von DYN₅₃₃QS entfernt, wodurch eine Interaktion der beiden eine andere Struktur forcieren könnte als es im *S.c.*Stt3 der Fall ist. Die Interpretation der Ergebnisse aus 2.2.3 erfolgte hauptsächlich für den Fall, wenn *C.j.*PglB als Monomer in der ER-Membran vorliegt. Auch wenn die Sequenz von PglB und *S.c.*Stt3 nur zu 11 % identisch ist, könnte es dennoch sein, dass das eubakterielle Homolog eine ähnliche Konformation wie *S.c.*Stt3 einnimmt. Es wurde daher versucht, durch Annäherung der Struktur von PglB an die von *S.c.*Stt3 mögliche strukturelle Divergenzen aus dem Weg zu räumen und so die Wahrscheinlichkeit eines Einbaus in den Komplex zu erhöhen. Es ist wahrscheinlich, dass Aufgaben wie Dolichofixierung des LLOs und Scannen der naszierenden Polypeptidkette durch Aufnahme mehrerer Proteine in die OST nicht auf die Untereinheit Stt3 beschränkt ist. Daher bestand die Möglichkeit, dass PglB durch Komplexintegration seine Selektivität für Undekaprenolanker, und auch in Hefe Aktivität mit herkömmlichem DolPP-GlcNAc₂ zeigt. Daher wurde versucht, durch Angleichung an die bekannten Faktoren von Hefe (WWDYG 14 Aminosäuren vor glykosyliertem Sequon) ein Stt3-Homolog zu generieren, welches in den Komplex eingebaut werden kann und somit möglicherweise den Phänotyp einer *S.c.*Stt3-Defizienz komplementiert.

Sollte die nicht erfolgte Inkorporation in den Komplex auf einer veränderten Struktur der C-terminalen Domäne basieren, würde die Insertion einer N-Glykosylierungsstelle im gleichen Abstand zu dem Motiv WWDYG wie in Hefe zumindest diese Limitierungen ausräumen. Durch Lokalisation von NVN₃₁₁QT zwischen den *Loops* zweier Transmembranspannen ist es unwahrscheinlich, dass das glykosyierte Motiv an der Ausbildung der Tertiärstruktur des C-Terminus beteiligt ist. Daher wurde die Einzelmutante S535I von *C.j.*PglB verwendet, in welcher durch die Mutation keine Glykosylierung in der C-terminalen Domäne mehr stattfand. Nachfolgend sollte nun 14 Aminosäuren entfernt vom Motiv WWDYG das Sequon aus

ERGEBNISSE und DISKUSSION

*S.c.*Stt3 eingeführt werden. In Stt3 aus *S. cerevisiae* folgen zwei Akzeptorsequons direkt aufeinander. Auch wenn Analysen ergaben, dass nur das zweite Sequon glykosyliert wird (Li *et al.*, 2005), wurde die gesamte Sequenz DNNTWN₅₃₉NT in den C-Terminus von PglB eingebracht. Die genaue Lokalisation ist in Abb. 18 abgebildet.

C.j.PglB	..WWDYGPVRYYSDVKTLVD	GGKHLGKD	NFFP
C.j.PglB mut..	WWDYGPVRYYSDVKTLVD	DNNTWNNT	NFFP

Abb. 18: Änderung der Sequenz von *C.j.PglB* bei Insertion des Motivs DNNTWNNT aus *S.c.Stt3*. Nach 14 Aminosäuren des Motivs WWDYG wurde über zielgerichtete Mutagenese das Glykosylierungssequon DNNTWNNT aus Hefe-Stt3 in *C.j.PGLB* (C425Y_V451E_R496Q_S535I) im Vektor pVT100-ZZ eingebracht. Identisch erhalten gebliebene Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

Hierzu wurde das Konstrukt *C.j.PGLB* im Vektor pVT100-ZZ verwendet, in welchem bereits die Mutagenesen C425Y_V451E_R496Q eingeführt worden waren, und wie oben erwähnt, S535I zur Eliminierung des endogenen Glykosylierungssequon DYN₅₃₃QS. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde über PCR nun sukzessive das doppelte Sequon DNNTWNNT aus *S.c.Stt3* eingeführt. Zunächst wurde WNNT eingebracht, anschließend das davor liegende Motiv DNNT. Da im temperatursensitiven Stamm *stt3-7* zunehmend Reversion des Unterglykosylierungsphänotyps beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), wurde der Stamm YG157 für nachfolgende Analysen verwendet. Dieser Hefestamm enthält einen Galaktose-induzierbaren Promotor vor dem genomischen Stt3 integriert. Folglich findet bei Anzucht mit Galaktose Expression, bei Verwendung von Glukose-Medium hingegen Repression von *S.c.Stt3* statt (Zuferey *et al.*, 1995). Neben Wachstum bei an- und abgeschaltenem endogenen Stt3 wurde auch der Glykosylierungsstatus in den jeweiligen Kulturen untersucht. Sollte die Integration von DNNTWNNT eine Struktur des C-Terminus ähnlich des *S.c.Stt3* bedingen, könnte ein Einbau in den Komplex erfolgen. Auch wenn für PglB gilt, dass nur D/E-X-N-X-S/T erkannt wird, könnte diese Limitierung durch den Komplex aufgehoben werden. Folglich könnte eine Komplementation des Phänotyps bei Abschaltung von *S.c.Stt3* in YG157 möglich sein. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 gezeigt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

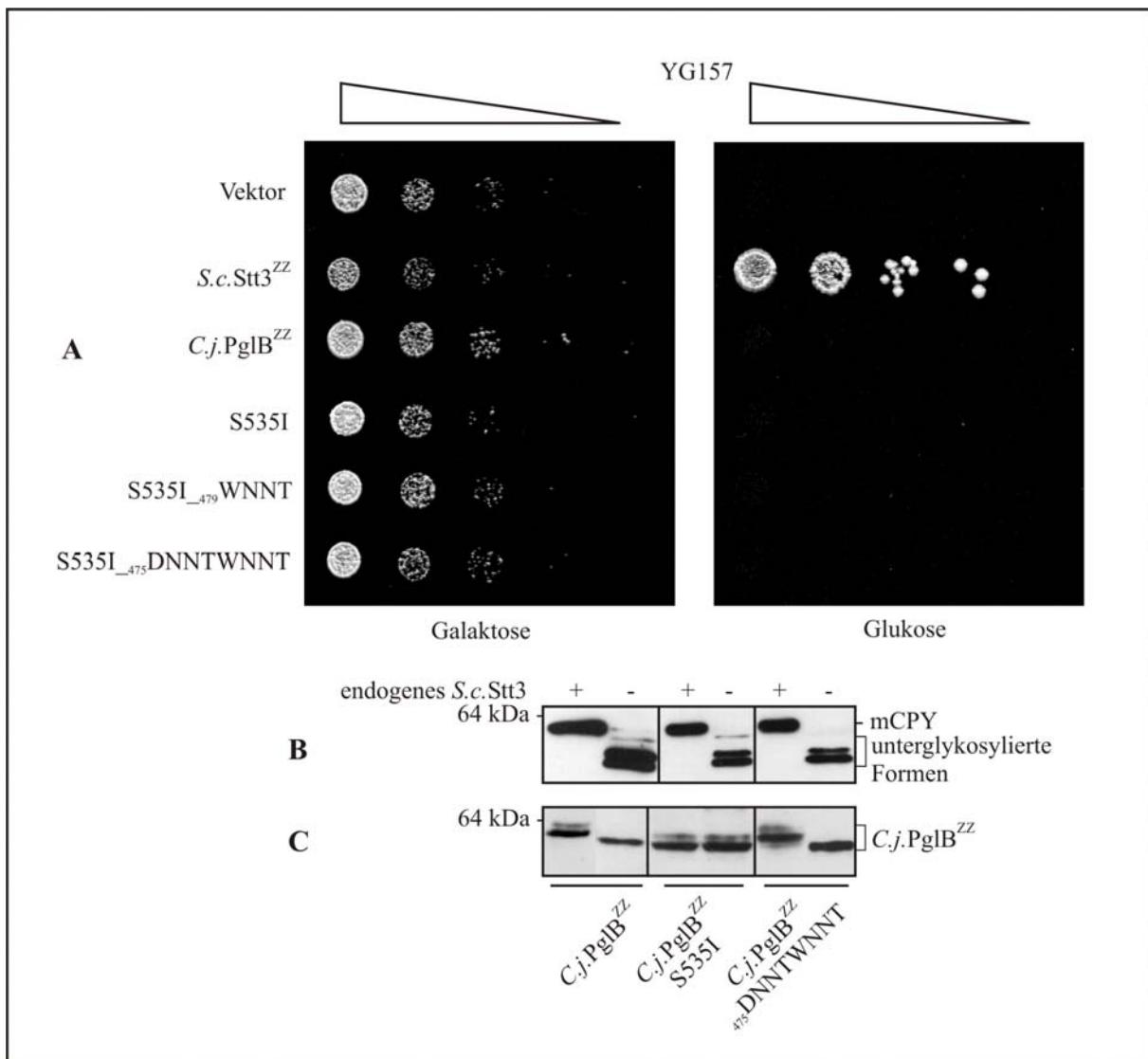


Abb. 19: Analyse von *C.j.PglB^{ZZ}* und Mutanten im Glykosylierungssequon im Stamm YG157. Zellen wurden in Selektivmedium mit Galaktose bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen und mit Glukose-haltigem Minimalmedium gewaschen. Für den Tüpfeltest wurden von 1 OD-Einheit 5 Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ hergestellt und je 3 µl auf Vollmedium mit Galaktose bzw. Glukose gebracht (A). Für die Western Blot Analyse wurde eine Kultur mit den gewaschenen Zellen auf OD₆₀₀ 0.05 angeimpft, und für mindestens 8 h bei 30°C inkubiert (B, C). Die Membran von (B) wurde mit anti-CPY Antikörper dekoriert, von (C) mit anti-mouse IgG. "+" kennzeichnet die Expression, "-" die Repression von *S.c.Stt3*.

Wie aus Abb. 19 A und B ersichtlich, kann auch das PglB mit DNNTWNNT den Unterglykosylierungsphenotyp von YG157 bei Repression von Stt3 nicht komplementieren. Inkubiert man die Zellen auf Platten mit Glukose, kann nur der Stamm mit *S.c.Stt3^{ZZ}* wachsen, alle anderen Varianten sind dazu nicht in der Lage (Abb. 19 A). Wie es für *C.j.PglB^{ZZ}* und der zugehörigen Mutante S535I in *stt3-7* bereits gezeigt werden konnte (Abb. 14 A bzw. Daten nicht gezeigt), können diese Homologe den Unterglykosylierungsphenotyp nicht komplementieren. Bei Abschaltung von *S.c.Stt3* findet man mit beiden Konstrukten nur die Banden der nackten und einfach glykosylierten Form der CPY (Abb. 19 B). Ebenso verhält es sich für die Mutan-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

te, in welcher das Sequon aus Hefe insertiert wurde: *C.j.PglB^{ZZ}* DNNTWNNT kann weder wachsen, noch zeigt die CPY eine Verbesserung im Glykosylierungsmuster (Abb. 19 A und B). Die Analyse der Expression der PglB-Proteine in Abb. 19 C erlaubte die Verifizierung, dass das eingeführte Sequon DNNTWNNT auch in PglB erkannt und besetzt wird. Das bereits in 2.2.4 diskutierte Ergebnis für *C.j.PglB^{ZZ}* zeigt bei intakter Glykosylierung überwiegend die an N₅₃₃QS glykosyierte Form sowie weitaus weniger die 2fach modifizierte Form. Ist aufgrund der Repression des endogenen Stt3 die Glykosylierung stark reduziert, findet man nur die nackte Form. Ist durch die Mutation S535I N₅₃₃QS eliminiert, findet man sowohl bei Expression, als auch bei Repression den gleichen Phänotyp: Überwiegend die nackte Form, daneben ein Hauch der an N₃₁₁QT modifizierten Variante. Ist das gesamte Sequon DNNTWNNT insertiert, findet man das Erscheinungsbild wie bei *C.j.PglB^{ZZ}*, d.h. bei Expression von *S.c.*Stt3 eine prominente einfach glykosyierte Form neben einer moderaten zweifach modifizierten. Bei Repression hingegen ist wieder nur die unglykosyierte Version von PglB^{ZZ} zu finden. Dieses Ergebnis belegt, dass das Sequon auch in PglB besetzt ist. Nachdem die einfach glykosyierte Bande bei Vergleich von *C.j.PglB^{ZZ}* mit und ohne DNNTWNNT die gleiche Laufhöhe zeigt, erfolgt die Glykosylierung wohl auch nur an einem Asparagin im Motiv DNNTWNNT. Somit sollte die gleiche Bedingung wie in *S.c.*Stt3 geschaffen sein, ein glykosyierte Akzeptorsequon 14 Aminosäuren nach dem konservierten Motiv WWDYG.

Bleibt zusammenfassend zu sagen, dass auch die Insertion des Akzeptorsequons DNNTWNNT in PglB zu keinem in Hefe funktionellem Protein führte. Ebenso wie das Ausgangskonstrukt *C.j.PglB^{ZZ}* und die Triplemutante C425Y_V451E_R496Q kann die Mutante S535I_DNNTWNNT *S.c.*Stt3 nicht ersetzen. Da ein Nachweis über Integration in den Komplex aussteht, bleibt erneut zu spekulieren: Wird auch die neue Mutante S535I_DNNTWNNT nicht in den Komplex eingebaut, ist klar, weshalb keine Glykosylierungsaktivität zu beobachten ist. Wird das Protein jedoch inkorporiert, könnte die Interaktion mit anderen Untereinheiten gestört sein, was zu Inaktivität des Komplexes führt. Ebenso kann man vermuten, dass auch bei Einbau die charakteristischen Eigenschaften von PglB bestehen bleiben und das Homolog nur Akzeptorsequons Glu/Asp-X-Asn-X-Ser/Thr mit isoprenolgebundenem Oligosaccharid modifiziert. Vor allem unter letzter Bedingung wäre eine N-Glykosylierung in Hefe nicht möglich.

2.3 Untersuchungen zu Stt3-Homologen aus *Leishmania major*

2.3.1 *Leishmania major* codiert vier Stt3-Homologe

Dieser Abschnitt der Arbeit befasst sich mit dem Stt3-Homolog aus *Leishmania major*, einem zur Familie der Trypanosomatidae gehörenden Organismus. Wie in 1.4 erwähnt, ist in anderen Vertretern dieser protozoischen Parasiten N-Glykosylierung bereits beschrieben. In *Trypanosoma cruzi* wurde ein Biosyntheseweg analog dem aus Hefe und Höheren Eukaryoten identifiziert, in welchem ein an der ER-Membran assembliertes Oligosaccharid von seinem Dolicholanker auf das konservierte Akzeptorsequon Asn-X-Ser/Thr übertragen wird. Während der Untersuchungen wurden jedoch zwei Besonderheiten entdeckt: Zum einen besteht das Glykan je nach Entwicklungsphase des Protozons aus GlcNAc₂Man₆₋₉ und ist, wenn überhaupt, nur vorübergehend glukosyliert. Zum anderen deuten Genomanalysen an, dass nur ein Stt3-Homolog vorliegt und die OST einzig aus *T.c.*Stt3 besteht (zusammengefasst in Parodi, 1993). Wie sich zeigte, besitzt das Enzym keine Präferenz für das optimale Substrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃, sondern transferiert Glykane von GlcNAc₂Man₆₋₉ ohne erkennbare Spezifität (Bosch *et al.*, 1988). Nachfolgend sollte überprüft werden, ob das Stt3-Homolog aus *L. major* *S.c.*Stt3 ersetzen kann, wie es für *T.c.*Stt3 nach Beginn der Untersuchungen beschrieben wurde (Castro *et al.*, 2006). Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob das Homolog in den Komplex eingebaut werden kann und falls ja, inwiefern sich dies auf die Substratspezifität von *L. major* Stt3 bzw. des Komplexes auswirkt. Hieraus könnten wichtige Erkenntnisse über die Funktion von Stt3 innerhalb des oligomeren Enzyms erfasst werden.

Das *STT3*-Homolog aus *L. major* wurde freundlicherweise bereits kloniert von Françoise Routier (Hannover) bereitgestellt. Es lagen vier Klone vor, benannt mit 2191-2194 nach F. Routier, welche sich in ihrer Sequenz z.T. stark voneinander unterscheiden. Wie das *Alignment* der vier Sequenzen in Abb. 20 zeigt, ist sowohl am N-Terminus als auch vor Beginn der C-terminalen Domäne (ungefähr bei Aminosäure 600 in Klon 2191) große Sequenzvariabilität zu beobachten. Über weite Teile der postulierten Transmembranspannen sowie der luminalen Domäne hingegen findet man absolute Identität. Herausstechend ist, dass die Klone 2191, 2192 und 2194 untereinander zu 80 % identisch sind, und sich 2193 von ihnen vor allem durch eine Extension im C-Terminus (ca. ab Aminosäure 700) unterscheidet.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

2191PAKNQHKGGGDGDPPTSPAAESTKVNTSDGAAVDSTLPPSDETYLFHCRAAPYSKLSYAFKGIMIVLILC	73
2192GSKGTAAQRATKASRLKGVARITAPAAITVEAVATGTPSVHEGVSAFSGVRMLLLFF	59
2193TTRSAVAPPSTAAPKEASSETIILIGLYKMPSQTRSILYSSCFAVAMAI	48
2194	GKRGNGLGDSGAAATASREASAQAEDAASQTKTASPPAKVILLPKTLT.DEKDFIGIFPFPPFWPVHFVLTVALFVLA	79
2191	AIRS....AYCVRLISVQIYGYIIEFDPWFNRYRAAEYMSTMHGWSAFFSWFDYMSWYPLGRPGVGTTYPGLQLTAVAIHR	149
2192	SFLYCLKNAYGLRMISVQIYGYIIEFDPWFNRYRAAEYMSTMHGWSAFFSWFDYMSWYPLGRPGVGTTYPGLQLTAVAIHR	139
2193	ALPI....AYDMRVRSIGVYGYIEHSSDPWFNRYRAAEYMSTMHGWSAFFSWFDYMSWYPLGRPGVGTTYPGLQLTAVAIHR	124
2194	SCFQ....AFTVRMISVQIYGYIIEFDPWFNRYRAAEYMSTMHGWSAFFSWFDYMSWYPLGRPGVGTTYPGLQLTAVAIHR	155
2191	ALAAAGMPMSLNNVCVLMPAWE[GAIATATIALIAFESESICMAWAALSFESIIPAHLMRSMAGEFDNECIAVAAMLLTF	229
2192	ALAAAGMPMSLNNVCVLMPAWE[GAIATATIALMTYENSGSGIAAIAAFIFSIIPAHLMRSMAGEFDNECIAVAAMLLTF	219
2193	ALAAAGMPMSLNNVCVLMPAWE[SLVSSAMALLAHESGNMVASISSILFSVVP AHLMRSMAGEFDNECIAVAAMLLTF	204
2194	ALAAAGMPMSLNNVCVLMPAWE[GAIATATIAFCTYEASGSTVAAAALSFSIIPAHLMRSMAGEFDNECIAVAAMLLTF	235
2191	YCWVRSRLTRSSWPPIGVLTVGAVYGYMAAWGGYIFVLMVAMHAGISSMDWARNTYNPSLIRAYTLFYVVGTAIAVCVP	309
2192	YCWVRSRLTRSSWPPIGVLTVGAVYGYMAAWGGYIFVLMVAMHAGISSMDWARNTYNPSLIRAYTLFYVVGTAIAVCVP	299
2193	YCWVRSRLTRSSWPPIGVLTVGAVYGYMAAWGGYIFVLMVAMHAGISSMDWARNTYNPSLIRAYTLFYVVGTAIAVCVP	284
2194	YCWVRSRLTRSSWPPIGVLTVGAVYGYMAAWGGYIFVLMVAMHAGISSMDWARNTYNPSLIRAYTLFYVVGTAIAVCVP	315
2191	PVGMSPKSLEQLGALLVLV[ELCQVCEVIRARAGVEVRSRANFK..IRVRVFSVMAQVAALAIISVIAPICMFGPLSVR	387
2192	PVGMSPKSLEQLGALLVLV[ELCQVCEVIRARAGVEVRSRANFK..IRVRVFSVMAQVAALAIISVIAPICMFGPLSVR	377
2193	PVGMSPKSLEQLGALLVLV[IFCQSVCEAQRRRLGIARLSKEGVALLIRIDAFFVGIVAVATI...APAGFEKPLSLQ	361
2194	PVGMSPKSLEQLGALLVLV[ELCQVCEVIRARAGVEVRSRANFK..IRVRVFSVMAQVAALAIISVIAPICMFGPLSVR	393
2191	VRALFVEHTRTGNPLVDSVAEHHFADALAYLNLYHIVHLMWICSLPVQLLPLPSRNQ.YAV..IFVLVYSFMAYYESTRMV	464
2192	VRALFVEHTRTGNPLVDSVAEHRMTSPKAYAFFLDFTYPVWLLGTVIQLLGAFMGS.RKEARLFMGLHSLATYYFADRMS	456
2193	ANAIITGVSRTGNILVLDILLAQDASNLLMWQFLPFLGWAQMSAFLREIIRNYTYAK..SFILMYGVVGYFASQSV	439
2194	VRALFVEHTRTGNPLVDSVAEHQ[PASPEAMWAFLHVCGVIWGLGSIVLAVSTEVHY.SPSKVFWLINSGAV.YYESTRMA	471
2191	RLLILAGPVACLGASEVGTTILEWCFOQLFWDNGMRTADMVAAGDMPYQKDDHTSRGAGARQKQQKQKPGQVSARGSSTS	544
2192	RLLILAGPAAAAMTAGILGLVYEWCAQCLTGWASPGLSA.....AGSGGMDDFDNKRGQTQIQSSTA	518
2193	RMMVMMAPACIFTALLFRWALDYLGLSLFWAE.....MPPSFDTAACRGRQOQTAEESEAETKRKEEYNTM	507
2194	RLLLSGPAAACLSTGIFVGTTILEAAVOLSFWDSDATKTKQOKQAOHRORGAGKGSGRDDAKNATTARAFCDVFAGSSIA	551
2191	SEERPVRTLIPVDFRDAQMNRSAGKTNAALIVALTIGVLLPLAFVFHLS.CISSAYSFAGPRIVFQTOQLHTGEQVIVK	623
2192	NRNRGVRAHAAVAKSIKAGVNLLPLVLRVGVAVAILAVITGTPVVSQFQARCICQ[SAYSFAGPRIVFQAOQLHTGEQVIVK	598
2193	QVKKMSVRMLPFMLL.....LLFRLSGFIEDVAISRKMEAPGIVFPSEQVQGVSEKKVD	563
2194	WGHRMVLSSIAWALVTTAVSFFSSEFASHSTKFAEQ.....SSNPIMIVFAAVVQNRATGKPMNLIVD	614
2191	DYLEAYEWLRDSTPEDARVIAWWWDYGYQITGIGNRTSLADGNTWNHEHIATIGKMLTSPVAEAHSILVRHMADYVLIWAGQ	703
2192	DYLEAYEWLRDSTPEDARVIAWWWDYGYQITGIGNRTSLADGNTWNHEHIATIGKMLTSPVAEAHSILVRHMADYVLIWAGQ	678
2193	DYAGYLYLRLDSTPEDARVIAWWWDYGYQITGIGNRTSLADGNTWNHEHIATIGKMLTSPVAEAHSILVRHMADYVLIISAGD	643
2194	DYLKAYEWLRDSTPEDARVIAWWWDYGYQITGIGNRTSLADGNTWNHEHIATIGKMLTSPVAEAHSILVRHMADYVLIWAGQ	694
2191	SG..DIMKSEHMARIGNSVYHDICFPDDPLCQQFGFHRNDYSRPTFMMRA.....SLLYNL	756
2192	SG..DIMKSEHMARIGNSVYHDICFPDDPLCQQFGFHRNDYSRPTFMMRA.....SLLYNL	731
2193	TYFSDLNRSFEMARIGNSVYHDICFPDDPLCQQFGFHRNDYSRPTFMMRA.....SLLYNL	723
2194	SG..DIMKSEHMARIGNSVYHDICFPDDPLCQQFGFHRNDYSRPTFMMRA.....SLLYNL	747
2191	FEAGKRKGKVNPNSLQEVYSSKYGLVRIFKVMNVSAESKKWADPANRVCHPPGSWICPGQYPPAKEIQEMELAHRVPDF	836
2192	FEAGKRKGKVNPNSLQEVYSSKYGLVRIFKVMNVSAESKKWADPANRVCHPPGSWICPGQYPPAKEIQEMELAHRVPDF	811
2193	HSTGWTGVTGVTILNETLFOHVFTSPQGLMRIFKVMNVSAESKKWADPANRVCHPPGSWICPGQYPPAKEIQEMELAHQHTNF	803
2194	FEAGKRKGKVNPNSLQEVYSSKYGLVRIFKVMNVSAESKKWADPANRVCHPPGSWICPGQYPPAKEIQEMELAHRVPDF	827
2191	QMDKHKHKETHHHKA	851
2192	QMDKHKHKETHHHKA	826
2193	KDLIDPRITWGSRR	818
2194	CVTNADRKNINVGSYQEELYMRRMRESENRR	856

Abb. 20: Sequenzalignment der vier unterschiedlichen Isoformen des Stt3-Homologs aus *Leishmania major*. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, konservative Austausche hingegen grau. Die Identität beträgt 67 %. Es wurde die Bezeichnung der Klone 2191-2194 von F. Routier (Hannover) übernommen.

Wie eine Analyse der Proteinsequenz zeigte, wird für das Stt3-Homolog aus *L. major* eine ähnliche Topologie wie für *S.c.* Stt3 vorhergesagt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

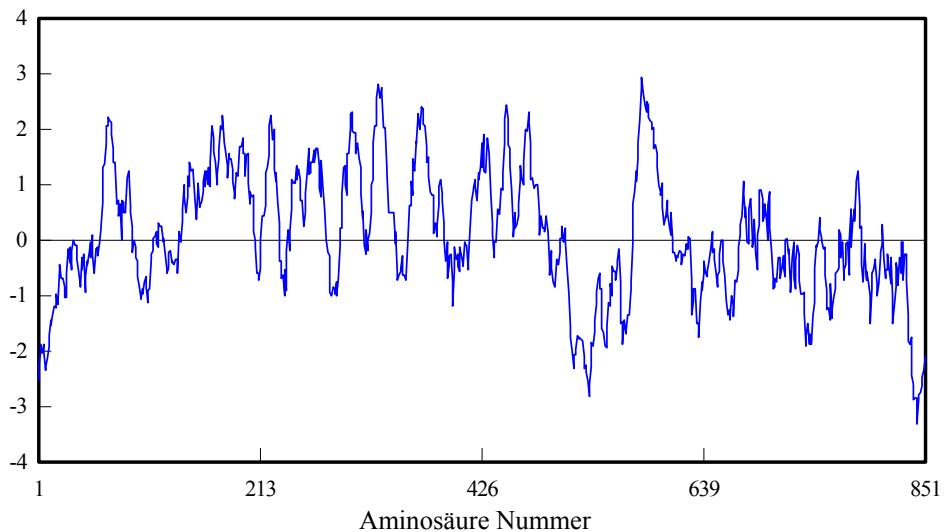


Abb. 21: Hydropathie Plot für *L.m.2191*. Der Plot wurde mit dem Programm DNAMAN erstellt.

Stellvertretend für die anderen Isoformen, zeigt der Hydropathie Plot von *L.m.2191* 11-12 Transmembranspannen und einen löslichen, hydrophilen C-Terminus, ähnlich der Vorhersage für das Protein aus Hefe. Für *S.c.*Stt3 wurde die Existenz von 11 Transmembranspannen experimentell bestätigt (Kim *et al.*, 2005), was dafür spricht, dass das protozoische Homolog eine nahezu identische Topologie besitzt und somit wohl eine ähnliche Konformation einnimmt.

Wie der Sequenzvergleich in Abb. 22 zeigt, resultiert die vorhergesagte ähnliche Topologie weniger aus Homologie zwischen den beiden Stt3-Proteinen aus Hefe und Leishmania. Die Identität der beiden Vollängenkonstrukte beträgt nur 26 %, die C-terminalen Domänen wiesen 31 % auf (nicht gezeigt). Es scheint eine strukturelle Konservierung erfolgt zu sein, welche nicht auf Sequenzhomologie gründet. So weist der N-Terminus von *L. major* eine Extension auf und auch innerhalb des Proteins ist ab Position 490 ein 67 Aminosäure langer *Spacer* im Vergleich zum Homolog aus *S. cerevisiae* zu beobachten. Übereinstimmend jedoch ist Konservierung im Motiv WWDYGY zu finden.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

S.c.Stt3MGSDRSCVLSVFQTLKIVIFVAIFGAIS	30
L.m.2191	PAKNQHKGGGDGPDTSTPAAESTKVNTSDGAVDSTLPPSDETYLFHCRAAPYSKLSYAFKGIMTVLILCAIRSAQ		80
S.c.Stt3	SRLFAVIKFESIHEFDWFNYRAITKYLVNNFSFYKFLNWFDRTWYPLGRVIGCTLYPGIMITSAFIWHALRNWLGLPID		110
L.m.2191	VRLISVQIYGYLIHEFDWFNYRAAEYMSTHGWSAFFSWDYMSWYPLGRPGCSTTYPGLQITAVA1HRALAAAGMPMSL		160
S.c.Stt3	IRNVCVLFLAPLFGSVTAWATYEFTKEIKDASAGLLAAGFIAIPGYISRSVAGSYDNEDIAITLILMVTFMFWIKAQKTGS		190
L.m.2191	NNVCVILMPANFGAIATAFLALIAFEVESICMAAAWALSFSIIPAHLMRSVAGEFDNECIAAVAMLLTFYQWVRSLRIRS		240
S.c.Stt3	IMHATCAALFYF.YMWSAWGGYHITNLIPHLVFLILMGRYSSKLYS....AYTTWYAIGTVASMQIPFVGFIPIRSND		265
L.m.2191	SWPIGVLTVGAVGYMAAWGGYEVINMVAMHAGISSMDWARNTYNPSLLRAYTLEYVVGTAIAVCVPPVGMSBPKSLE		320
S.c.Stt3	HMAALG.VEGLIQINAFGDFVKQQISTAFKVIMMVSFLFLILVIGVWGLSAITYMGLIAPWTGRFYSLWDTNYAKIHIP		343
L.m.2191	QLGALLVIVELCGLOVCEVLRARAGVEVRSRANFKIRVRVFSVMA...AIAISVLAFTGYFGPLSVRVRALFVEHTR		397
S.c.Stt3	IIASVSEHQPVSWPAFFFDTFHFLWFPAGVFLFLDLKDEHV.....FVIAYSVLCSYFAGVMVRLMLTLIPVICVS		416
L.m.2191	TGNPLVDSVAEHHPADALAYLNLYHVHLMWICSLPVQLILPSRNQYAVIFVILVYSFMAYFSTRMVRLILLACPVACLG		477
S.c.Stt3	AAVALKSKIFDIYL.....	D	430
L.m.2191	ASEVGGTILMEWCFCQQLFWNDNGMRTADMVAAGDMPYQKDDHTSRGAGARQKQQKQPGQVSARGSTSSEERPRTLIPVD		557
S.c.Stt3	FKTSDRKYAIKPAALIAKLLIVSGSFIFYLNIEVFVHSTWVTRTAYSSPSVVLPSQTPDGKLALIDDFR..EAYWILRMNSD		508
L.m.2191	FRRDAQMNRWSAGKTNAAILIVALTIGVILPFIAFVFLHSCISSAYSFAGPRIVBQTQLHTGEQVIVKDYLEAYEWLROSTP		637
S.c.Stt3	EDSKVAWWWDYGYCIGCMADRTILIVDNNTWNNTIIHIAIVGKAMASPEEKSYEILKEHDVYVIVIFGGGLIGFGDDINKFL		588
L.m.2191	EDARVLAWWWDYGYCIGIGNRISIADGNTWNHEHIAFIGKMLTSVVAEHSILVRHMA.CYVLIWAGS....GDLMKSPH		712
S.c.Stt3	WMIRISEGIWPEEIKERDFYTAEGEYRDAFASETMRNSLLYKMSYKDFPQLFNGQQATDRVRQQMINTPLDVPLDYFDE		668
L.m.2191	MARIGNSVYHDICPDDPLCQQFGFHRNDYSRPTPMRASLLYNLHEAGKRKGVKVNPSLFQEYVSSKYGLVRIFKVMNV		792
S.c.Stt3	VFTSENWMVRIYQLKKDDAQGRTLRDVGELTRSSTKTRRSIKREPELGLRV		718
L.m.2191	AESKKWVADPANRVCHPPGSWICPGQYPPAKEI1QEMLAHRVPFDQMDKHKKHKETHHK		851

Abb. 22: Sequenzalignment von S.c.Stt3 und L.m.2191. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die Identität beträgt 26 %.

2.3.2 Die drei Stt3-Isoformen L.m.2191, L.m.2192 und L.m.2194 komplementieren den Unterglykosylierungsphänotyp nach Abschaltung von S.c.Stt3 fast vollständig

Wie bereits erwähnt, lagen die Isoformen fertig kloniert vor. Im Vektor pYES Cup1 H-Flag-K konnte durch Zugabe von Kupfersulfat die Expression der N-terminal Flag-epitopmarkierten Stt3-Homologe induziert werden. Die resultierenden Polypeptide wurden entsprechend ^{Flag}S.c.Stt3 für die Positivkontrolle mit Stt3 aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. ^{Flag}L.m.2191-2194 für die Homologe aus *Leishmania major* benannt.

Um einen ersten Anhaltspunkt bezüglich der Funktionalität der homologen Proteine aus *Leishmania major* zu erhalten, wurden die Konstrukte in dem Stamm YG157 exprimiert, welcher einen Galaktose-induzierbaren Promotor vor dem genomisch codierten Stt3 integriert hat. Somit kann man in Medium mit Galaktose die Expression des endogenen Proteins aufrecht erhalten, wohingegen in Anwesenheit von Glukose Repression erfolgt und dadurch der Effekt des co-exprimierten Homologs verfolgbar ist. Zusätzlich musste 0.5 mM Kupfersulfat zugegeben werden, um den plasmidär codierten Kupfer-Promotor anzuschalten.

Zunächst wurden die einzelnen Transformanten auf ihr Wachstum analysiert. Die Zellen wur-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

den, wie in der Legende von Abb. 23 beschrieben, angezogen und die Überlebensfähigkeit auf Platten mit Galaktose und Glukose untersucht. Auf letzterem erfolgt die Repression des endogenen Stt3, wodurch der Einfluss der *L. major* Konstrukte auf das Wachstum deutlich wird.

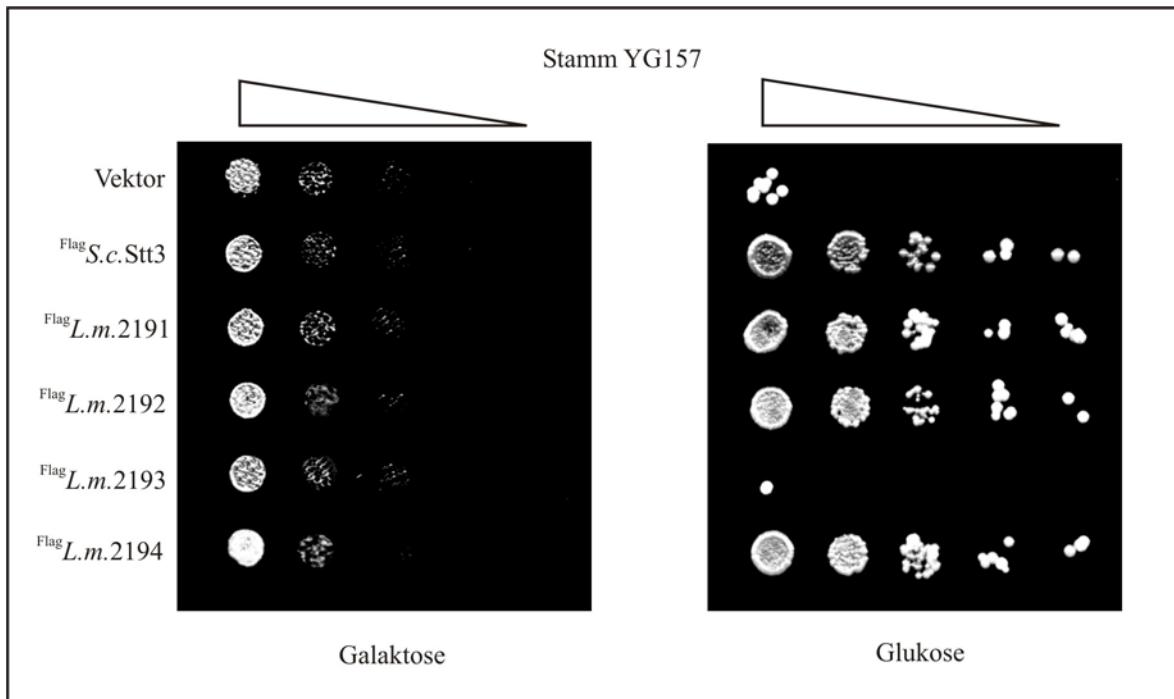


Abb. 23: Wachstumstest der verschiedenen Isoformen von *L.m.*Stt3 sowie Kontrollen im Stamm YG157. Die einzelnen Transformanten 2191-2194 und die Positivkontrolle *S.c.*Stt3 in pYES Cup1 H-Flag-K sowie der leere Vektor als Negativkontrolle wurden in YNB-d.o.-ura mit Galaktose in Gegenwart von 0.5 mM Kupfersulfat auf OD₆₀₀ 1-2 bei 30°C angezogen. 1 OD₆₀₀-Einheit wurde geerntet, mit Minimalmedium mit Glukose gewaschen und in selbigem aufgenommen. Von Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ wurden je 3 µl auf Vollmedienplatten mit 0.5 mM Kupfersulfat sowie Galaktose bzw. Glukose gebracht und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Wie zu erwarten, wachsen alle Zellen auf Platten mit Galaktose, bedingt durch die Expression des intakten, genomisch codierten Stt3. Auf Glukose-haltigem Medium hingegen zeigt der Kontrollstamm mit leerem Plasmid kein Wachstum mehr. Aufgrund der Repression von *S.c.*Stt3 ist kein intakter OST-Komplex mehr vorhanden und die ausbleibende N-Glykosylierung führt zu Letalität der Zellen. Gleiche Situation ist in Zellen mit $\text{Flag } L.m. 2193$ zu finden: Die Überexpression führt zu keiner Komplementation des Wachstumsphänotyps, was dafür spricht, dass die Isoform 2193 kein funktionelles Protein codiert. Umgekehrtes ist für $\text{Flag } L.m. 2191$, $\text{Flag } L.m. 2192$ und $\text{Flag } L.m. 2194$ zu beobachten: Die Transformanten wachsen auf Glukose-Medium wie ihre Positivkontrolle $\text{Flag } S.c. \text{Stt3}$, ein Indiz, dass diese Allel-Produkte die funktionelle Rolle des Hefe-Stt3 einnehmen können. Dies legt die Vermutung nahe, dass die homologen Proteine aus *L. major* bei Repression von *S.c.*Stt3 in den Komplex inkorporiert werden und einen funktionellen OST-Komplex generieren. Als andere Möglichkeit könnte man sich vorstellen, dass sie frei in der ER-Membran vorliegen und dort als solches katalytisch aktiv sind.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Um eine Manifestation auf Glykosylierungsebene zu bestätigen, wurde in den einzelnen Transformanten der Status der CPY analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

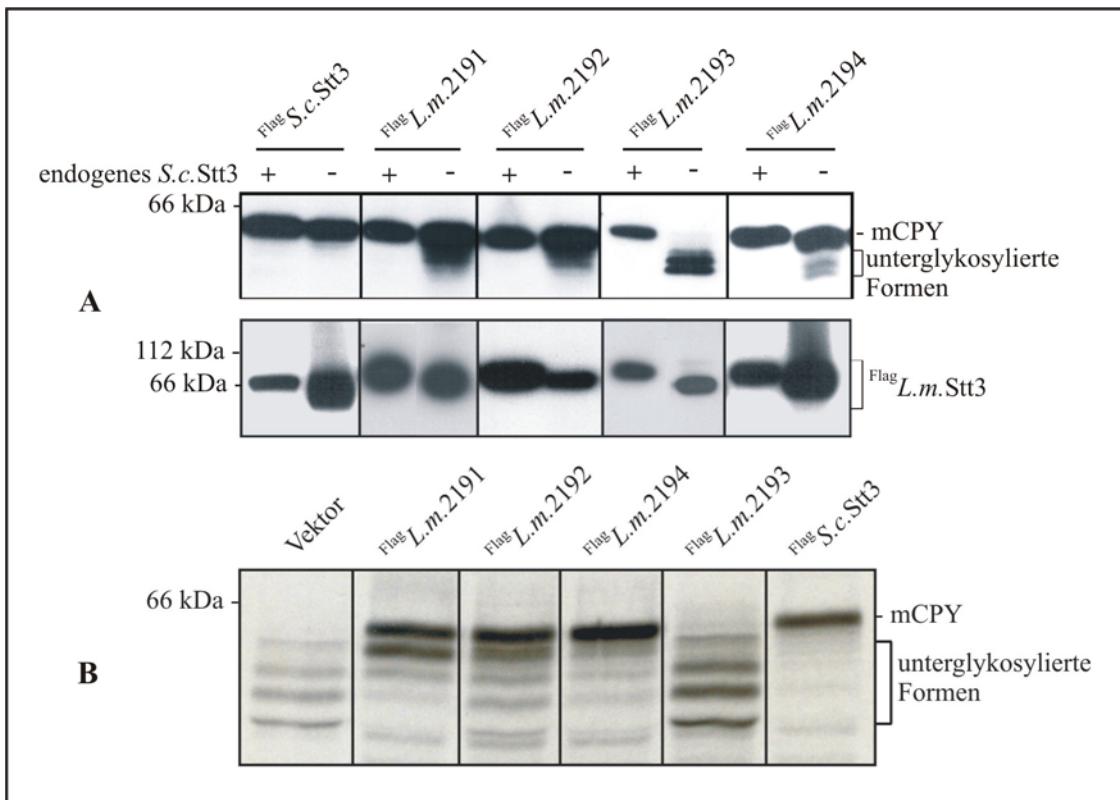


Abb. 24: Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY im Stamm YG157 mit *L.m.*Stt3 bzw. *S.c.*Stt3. Die Analyse erfolgte über *Western Blot* (A) sowie über radioaktive Markierung (B). In (A) wurden die jeweiligen Zellen bei Expression ("+") sowie bei Repression (" -") des endogenen Stt3 untersucht. Nach Abschaltung für 8 h bei 30°C wurden Cytosol auf CPY mit anti-CPY-AK und Membranfraktion auf Expression der Leishmania-Homologe mit anti-Flag-AK überprüft. In (B) wurden für 8 h in Glukose-Medium vorinkubierte Zellen für 45 min mit ³⁵S-Methionin/Cystein markiert und nach Aufarbeitung die CPY über Autoradiographie sichtbar gemacht.

Wie aus den Ergebnissen des Wachstumstest zu erwarten war, basiert die Komplementation auf einer Restauration der Glykosylierung. Die Analyse der CPY über *Western Blot* zeigt deutlich, dass in Stämmen mit den Isoformen ^{Flag}*L.m.*2191, ^{Flag}*L.m.*2192 und ^{Flag}*L.m.*2194 bei Repression des endogenen Stt3 (" -") dennoch überwiegend die mature Form der CPY zu finden ist. Jedoch scheinen die homologen Vertreter aus *L. major* nicht vollständig funktionell zu sein, da divergierend vom Status der CPY in Zellen mit *S.c.*Stt3, neben der vierfach glykosylierten Form auch Banden der unterglykosylierten CPY zu beobachten sind. Der Stamm YG157 mit ^{Flag}*L.m.*2193 hingegen repräsentiert den Phänotyp der Hefe ohne funktionelles Stt3-Protein, es ist im abgeschalteten Zustand nur die nicht- sowie einfache-glykosylierte Form der CPY zu sehen (Abb. 24 A). Da die unterglykosylierten Banden der CPY bei Analyse über *Western Blot* nur diffus zu erkennen waren, wurden die Zellen nach Repression des

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Hefe-Stt3 auch metabolisch mit radioaktivem Methionin/Cystein markiert. Wie in Abb. 24 B zu sehen, zeigt ^{Flag}*L.m.2193* und die Kontrolle die Leiter der mehrfach unterglykosylierten Formen der CPY. Übereinstimmend mit dem über *Western* Analyse erhaltenen Signal, findet man in Stämmen mit ^{Flag}*S.c. Stt3* nur die mature Form. In den anderen drei Transformanten hingegen sind in unterschiedlichem Muster neben der prominenten maturen Bande auch unterglykosylierte Formen zu erkennen. Somit kann bis jetzt gesagt werden, dass ^{Flag}*L.m.2191*, ^{Flag}*L.m.2192* und ^{Flag}*L.m.2194* zumindest teilweise funktionelle Homologe von *S.c. Stt3* darstellen. Zwischen den drei Isoformen konnte kein eindeutiger Unterschied im Glykosylierungsmuster der CPY ausgemacht werden, was vermuten lässt, dass sich diese nicht in der katalytischen Aktivität oder Funktion unterscheiden. Klar ist, dass ^{Flag}*L.m.2193* kein funktionelles Homolog von *S.c. Stt3* ist.

Neben der CPY wurde die Membranfraktion auf Expression der plasmidcodierten Proteine untersucht. Wie in Abb. 24 A dargestellt, werden alle Konstrukte sowohl in an- als auch im abgeschalteten Zustand exprimiert. Auch das nicht funktionelle ^{Flag}*L.m.2193* zeigt eine deutliche Bande, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass der letale Phänotyp auf Glukose (Abb. 23) nur ein Phänomen des Hintergrundstammes bei Abwesenheit *S.c. Stt3* ist. Entweder kann diese Version des Leishmania-Homologs im Gegensatz zu den anderen drei nicht in den Komplex eingebaut werden und ist deshalb katalytisch nicht aktiv oder aber ^{Flag}*L.m.2193* sitzt außerhalb des Komplexes in einer nicht aktiven Konformation. Für Verteter der Familie Trypanosomatidae ist bislang nicht gezeigt, ob N-Glykosylierung eine essentielle Modifikation darstellt. Es bleibt zu vermuten, dass, ähnlich *Campylobacter jejuni*, über Glykane die Anheftung an Wirtszellen vermittelt wird und Kolonialisierung erfolgt und somit die Pathogenität mit dem Grad an N-Glykosylierung steigt (Karlyshev *et al.*, 2004). Daher könnte es sein, dass die Isolierung des Gens *L.m.2193* aus einer Kolonie erfolgte, in welcher das Stt3-Homolog *per se* nicht aktiv ist. Es müssen nicht zwingend die Bedingungen der Expression in Hefe sein, weshalb dieses Genprodukt nicht katalytisch aktiv ist.

Vergleicht man die Signale der exprimierten Proteine liegt der Schluß nahe, dass es sich wie bei *S.c. Stt3* auch bei den Homologen aus *L. major* um Glykoproteine handeln muss. Vor allem im Falle von ^{Flag}*L.m.2193* ist bei Repression von *S.c. Stt3* eine deutliche Änderung im Laufverhalten zu beobachten (Abb. 24 A). Sequenzanalysen geben für alle vier Isoformen potentielle Glykosylierungsstellen an, welche in Tab. 10 aufgelistet sind.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

	Größe (Aminosäu- ren)	berechnetes Mole- kulargewicht (kDa)	apparentes Lauf- verhalten (kDa)	potentielle Glykosylierungsstellen in der C-terminalen, luminalen Domäne
<i>L.m.</i> 2191	851	94.3	80-84	N ₆₅₇ RT, N ₇₉₀ VS
<i>L.m.</i> 2192	826	90.5	80-82	N ₆₃₂ RT, N ₇₆₅ VS
<i>L.m.</i> 2193	818	90.6	82-84	N ₅₉₇ RT, N ₆₅₀ RS, N ₇₃₅ ET, N ₇₅₇ VS
<i>L.m.</i> 2194	856	94.0	80-82	N ₆₄₈ RT, N ₇₈₁ VS

Tab. 10: Größe und Molekulargewicht, sowie apparentes Laufverhalten und potentielle Glykosylierungsstellen in der C-terminalen Domäne von *L.m.*2191-2194. Das apparente Laufverhalten bezieht sich auf die Konstrukte mit N-terminalem *Flag*-Epitop, weshalb 1.2 kDa von der im *Western Blot* abgeschätzten Molekulargröße abgezogen werden müssen.

Für *L.m.*2191, *L.m.*2192 und *L.m.*2194 sind jeweils zwei, für *L.m.*2193 hingegen vier potentielle Glykosylierungsstellen vorhergesagt. Wie aus dem Ergebnis des *Western Blot* (Abb. 17 A) zu urteilen, ist in allen vier Isoformen mindestens eine davon modifiziert. Nachdem in *L.m.*2193 sogar vier Akzeptorsequons vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, dass das Homolog in Hefe anders glykosyliert wird als in *L. major* und so durch veränderte Konformation nicht aktiv ist.

Wie aus Tab. 10 zudem ersichtlich ist, zeigen analog *S.c.*Stt3 auch die Homologe aus *Leishmania major* anormales Laufverhalten, man detektiert Banden nicht beim errechneten Molekulargewicht von 90-94 kDa, sondern bei 80-84 kDa. Aufgrund der vielen Transmembranspannen sind die Proteine stark hydrophob und laufen schneller als berechnet.

2.3.3 Sporen mit *L.m.*2191 und *L.m.*2193 sind nicht lebensfähig

Wie die Ergebnisse aus 2.3.2 zeigen, scheinen ^{Flag}*L.m.*2191, ^{Flag}*L.m.*2192 und ^{Flag}*L.m.*2194 funktionelle Homologe von *S.c.*Stt3 zu sein. Da bei Analyse der CPY neben der maturen Form jedoch auch geringe Mengen an unterglykosylierter Carboxypeptidase Y zu beobachten war (Abb. 24 A und B), stellte sich die Frage, ob die drei oben genannten Varianten von *L.m.*Stt3 komplett die Funktion des Hefe-Homologs übernehmen können oder nur teilweise die Rolle ersetzen. Zu diesem Zweck wurde ^{Flag}*L.m.*2191, stellvertretend für die anderen beiden komplementierenden Isoformen, sowie ^{Flag}*L.m.*2193 in den diploiden Hefestamm *STT3/Δstt3* transformiert. In diesem Stamm ist eine Kopie des *STT3*-Gens disruptiert, mit dem Resultat, dass nach Sporulation und Tetradenvereinzelung nur die zwei Zellen mit der Wildtyp-Kopie wachsen können. Führt man das ganze in Gegenwart der Plasmide durch und codiert *L.m.*2191 für ein funktionelles Protein, würden alle vier Tetraden lebensfähig sein. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

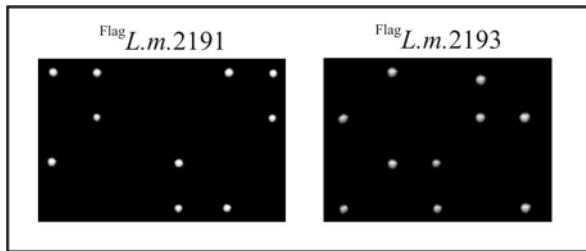


Abb. 25: Tetradenanalyse von $^{\text{Flag}}\text{L.m.2191}$ und $^{\text{Flag}}\text{L.m.2193}$ in Stamm $\text{STT3}/\text{Astt3}$. Die transformierten Stämme wurden auf Sporulationsmedium ausgestrichen und bei 25°C für 5 Tage inkubiert. Nach erfolgter Sporulation wurde mit Hilfe von Zymolyase die Zellwand angedaut, die Tetraden mittels eines Mikromanipulators vereinzelt, auf Vollmedienplatten mit 0.5 mM Kupfersulfat abgelegt und für 2 Tage bei 25°C inkubiert.

Wie zu erwarten, zeigt $^{\text{Flag}}\text{L.m.2193}$ eine 2:2 Segregation, was heißt, dass es kein funktionelles Protein darstellt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Wachstumstests und Analyse der CPY bei Repression von *S.c.*Stt3 ist $^{\text{Flag}}\text{L.m.2193}$ in keiner Weise zur Komplementation fähig (Abb. 23 und 24). Erstaunlicherweise ist jedoch der gleiche 2:2 Phänotyp im Falle von $^{\text{Flag}}\text{L.m.2191}$ zu beobachten: Tetraden mit genomischer *STT3*-Disruption können trotz Expression nicht wachsen. Auch wenn bei Abschaltung von Stt3 in YG157 mit $^{\text{Flag}}\text{L.m.2191}$ hauptsächlich die mature, vierfach glykosylierte Form der CPY zu finden ist (Abb. 24 A und B), reicht die katalytische Aktivität von *L.m.2191* scheinbar nicht aus, um den gesamten N-Glykosylierungsapparat in „Schwung“ zu halten. Bestimmte Glykoproteine scheinen nicht ausreichend glykosyliert zu werden, was bei Sporulation zu Letalität führt. Es könnte sein, dass *L.m.2191* nicht in den Komplex eingebaut wird, und in dieser monomeren, aktiven Form nicht oder weniger stringent mit dem Translokton assoziiert ist. Dadurch werden möglicherweise nicht alle gewöhnlich modifizierten Proteine erkannt und glykosyliert.

Versuche in Hefe zeigten, dass die Interaktion der Oligosaccharyltransferase mit dem Translokton über multiple Protein-Protein Kontakte vermittelt wird und nahezu jede Untereinheit daran beteiligt ist, wobei Ost4 die stärkste Wechselwirkung zeigt (Chavan *et al.*, 2005). Auch wenn es sich bei Ost4 um keine essentielle Untereinheit des Komplexes handelt, könnte ein effizienter Transfer über diesen Kontakt bedingt sein. Ergebnisse von Split-Ubiquitin-Studien in Säugern postulieren, dass Ost1 als Chaperon oder Eskorte fungiert, um N-Glykosylierung zu unterstützen. Wilson und High zeigten, dass Ost1 nicht direkt für den Transfer, wohl aber zur effizienten Modifizierung einiger Substrate nötig ist (Wilson und High, 2006). Sollte dies auf Hefe übertragbar sein, ließe sich spekulieren, dass Proteine der Sporulation betroffen betroffen sind. Es würde erklären, weshalb freies *L.m.*Stt3 sie nicht erkennt oder nur unzureichend glykosyliert, was zu einem letalen Phänotyp führt.

Sollte hingegen die Inkorporation in den OST-Komplex erfolgen, so wäre denkbar, dass durch

ERGEBNISSE und DISKUSSION

abweichende Struktur des protozoischen Homologs die Komplexbildung beeinträchtigt wird und ein *Scannen* der naszierenden Polypeptidketten weniger effizient abläuft, ob durch gestörte Interaktion innerhalb der OST oder mit dem Translokon. Es ist zudem bekannt, dass *in vivo* nur etwa 65 % aller Akzeptorsequons glykosyliert werden. Daher muss es zusätzliche Determinanten innerhalb eines Proteins geben, wodurch eine potentielle Glykosylierungsstelle tatsächlich modifiziert wird. Möglicherweise ist diese Strukturerfassung in *L. major* anders als in Höheren Eukaryoten oder weniger stringent.

2.3.4 *L.m.2191* überträgt DolPP-GlcNAc₂Man₆₋₉ *in vivo* und *in vitro* mit gleicher Effizienz

Wie bereits erwähnt, transferieren Vertreter der Trypanosomatidae Oligosaccharide unterschiedlicher Länge mit gleicher Effizienz. Entgegen der Situation in Hefe und Höheren Eukaryoten, wo das glukosyierte Glykan das optimale Substrat darstellt, wird GlcNAc₂Man₆₋₉ gleich effizient übertragen (Bosch *et al.*, 1988). Experimente mit der OST aus *S. cerevisiae* zeigten, dass der 3fach glukosyierte Donor mit einer 20-25fach höheren Rate übertragen wird als kürzere Oligosaccharide (Turco *et al.*, 1977). Es stellte sich daher die Frage, ob *L.major* wie andere trypanosomatidische Parasiten geringe Substratspezifität besitzt. Zudem sollte geklärt werden, ob *L.m.Stt3* im Falle eines Komplexeinbaus diese charakteristische Eigenschaft behält oder durch die OST vermittelte Präferenz für den Vollängendoron DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ zeigt.

Um die Frage nach der Donorspezifität näher zu beleuchten, wurden OST-Aktivitätstests mit unterschiedlich langen Glykanen durchgeführt. Tests mit ^{Flag}*L.m.2191* in An- und Abwesenheit des endogenen Stt3 im Stamm YG157 sollten Aufschluss über die Aktivität des Stt3-Homologs aus Leishmania geben. In Tab. 11 sind die im Test verwendeten Rohmembranen angegeben.

Rohmembranisolate von YG157	Zweck
+ <i>S.c.</i> Stt3 Vektor	Aktivität von Wildtyp-OST-Komplex in Hefe
- <i>S.c.</i> Stt3 Vektor	Hintergrundaktivität des Stammes bei Repression des endogenen Stt3
+ <i>S.c.</i> Stt3 ^{Flag} <i>L.m.2191</i>	Wildtyp-OST-Komplex in Anwesenheit von <i>L.m.2191</i>
- <i>S.c.</i> Stt3 ^{Flag} <i>L.m.2191</i>	<i>L.m.2191</i> mit Hintergrundaktivität des Stammes ohne <i>S.c.</i> Stt3

Tab. 11: Im OST-Aktivitätstest verwendete Membranisolale des Stammes YG157. Als Referenzstämme wurden Isolate von YG157 bei Expression ("+") und Repression ("−") des endogenen Stt3 verwendet. Um die Aktivität von ^{Flag}*L.m.2191* zu bestimmen, wurden Membranen in gleichem Status, jedoch bei Co-Expression von *L.m.Stt3* isoliert. Bei Anzucht wurden aus einer frischen Vorkultur in YNB-d.o.-ura mit Galaktose jeweils so viele Zellen geerntet, um 800 ml Selektivmedium mit Glukose bzw. Galaktose auf OD₆₀₀ 0.05 anzuimpfen, mit Glukose-Medium gewaschen und in selbigem aufgenommen. Die angeimpften Kulturen wurden für mind. 8 h bei 30°C inkubiert, wobei die OD₆₀₀ bei Ernte zwischen 1-2.5 betrug. Die Anzucht sämtlicher Kulturen erfolgte in Gegenwart von 0.5 mM Kupfersulfat.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Der Stamm YG157 bei Expression des genomisch codierten *S.c.Stt3* ("+") mit Leervektor als Kontrolle dient zur Messung der Aktivität des Wildtyp-OST-Komplexes. Membranen einer in Glukose-haltigem Medium angezogenen Kultur hingegen zeigen die Restaktivität des OST-Komplexes aus Hefe nach 8-stündiger Abschaltung von *S.c.Stt3* ("- Vektor"). Die Aktivität von "+ *L.m.2191*" sollte zeigen, ob durch die Co-Expression von *L.m.2191* ein gesteigerter Transfer von Glykanen, insbesondere von für Hefe suboptimalen kürzeren stattfindet. Noch deutlicher sollte ein Effekt bei Expression von *L.m.2191* in Abwesenheit eines katalytisch aktiven *S.c.Stt3* zu beobachten sein ("- *L.m.2191*"), wo nach Abzug der Hintergrundaktivität des Stammes ("- Vektor") nur die Aktivität des Stt3-Homologs aus *Leishmania major* sichtbar wird. Als Substratdonor für den OST-Test diente radioaktiv markiertes DolPP-GlcNAc₂, DolPP-GlcNAc₂Man₅, DolPP-GlcNAc₂Man₆, DolPP-GlcNAc₂Man₉ und DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Nach Inkubation der Membranen mit dem jeweiligen Glykosyldonor sowie einem synthetischen Oktapeptid der Sequenz GAYNSTSV wurde die Radioaktivität des gebildeten glykosylierten Peptids bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 angegeben.

	DolPP-GlcNAc ₂	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₆	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₉	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₉ Glc ₃
+ <i>S.c.Stt3</i> Vektor	100	100	100	100	100
- <i>S.c.Stt3</i> Vektor	9.5	34	46	54	51
+ <i>S.c.Stt3 L.m.2191</i>	-	115	173	202	103
- <i>S.c.Stt3 L.m.2191</i>	111	109	151	172	82

Tab 12: OST-Aktivitätstest von Membranen in An-/Abwesenheit von *S.c.Stt3* sowie *L.m.2191* mit unterschiedlich langen Glykosyldonoren. Je 100 µg Membranen wurden mit den entsprechenden radioaktiv markierten dolicholgebundenen Glykanstrukturen und Oktapeptid GAYNSTSV für 7.5 min bei 24°C inkubiert. Nach Folch-Verteilung wurden die obere und untere Phase getrennt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Die Werte sind in % angegeben, wobei die Ergebnisse der Reihe mit "+ *S.c.Stt3* Vektor" als 100 % gesetzt wurden, alle anderen Werte sind jeweils darauf bezogen. Der Test von "+ *S.c.Stt3 L.m.2191*" mit DolPP-GlcNAc₂ wurde nicht durchgeführt und ist mit "-" angegeben.

Bei Vergleich der Messreihe "+ Vektor" mit "- Vektor" wird deutlich, dass durch die Abschaltung des endogenen Stt3 die *in vitro* Aktivität rapide abnimmt. Bei Verwendung von Chitobiose, dem minimalen Substrat DolPP-GlcNAc₂, werden nur etwa 10 % des Oligosaccharids auf das Peptid GAYNSTSV übertragen. Vergleicht man die Werte für die Glykosyldonoren DolPP-GlcNAc₂Man₅₋₉, so fällt auf, dass die Aktivität des OST-Komplexes bei Abschaltung von Stt3 mit Anzahl der Mannosen steigt. Beträgt die Transferrate für DolPP-GlcNAc₂Man₅ nur 34 %, ist sie bei Angebot des Substrates mit insgesamt 9 Mannosen um 20 % höher und liegt bei 54 %. Zwischen den dolicholgebundenen Glykanen GlcNAc₂Man₉ und dem optima-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

len Volllängensubstrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ ist so gut wie kein Unterschied festzustellen, sie betragen 54 und 51 %. Somit ist die in Abb. 24 A und B beobachtete Unterglykosylierung der CPY im Stamm YG157 mit ^{Flag}*L.m.*2193 bei Abschaltung ("") von *S.c.*Stt3 auf eine um 49 % reduzierte Aktivität mit dem Volllängenoligosaccharid DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ zurückzuführen. Die aus Tab. 12 erschlossene Substratspezifität der Hefe-OST deckt sich mit den bereits veröffentlichten Daten, dass der Oligosaccharyltransferase-Komplex aus *S. cerevisiae* präferentiell das dreifach glukosyierte Substrat transferiert (Bosch *et al.*, 1988, Knauer und Lehle, 1999). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Untersuchungen mit Stt3 aus *Trypanosoma cruzi*, in welchem, wie bereits in 1.4 erwähnt, Glykane von der Zusammensetzung GlcNAc₂Man₅₋₉ substratunspezifisch mit gleicher Rate übertragen werden. Wie aus Tab. 12 ersichtlich, ist gleiches auch für *Leishmania major* zu beobachten. Bei Vergleich der Messreihe "+" Vektor" mit "+" *L.m.*2191" erhält man für DolPP-GlcNAc₂Man₅ in etwa die gleiche Transferrate. Mit DolPP-GlcNAc₂Man₆ findet eine Steigerung auf 173 %, mit DolPP-GlcNAc₂Man₉ sogar auf 202 % statt. Dies spricht dafür, dass das Stt3-Homolog aus *L. major* ohne Spezifität auch kürzere Zucker mit nahezu gleicher Effizienz überträgt. Ist das optimale Substrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ vorhanden, ist trotz Co-Expression von *L.m.*2191 kein gesteigerter Transfer zu beobachten, der Wert von "+" *L.m.*2191" liegt mit 103 % nur gering über der Kontrolle. Da bekannt ist, dass in Trypanosomen kein glukosyierte Donorsubstrat vorhanden ist, scheint das katalytisch aktive Stt3-Homolog DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ nicht als Substrat zu erkennen. Ebenso scheint DolPP-GlcNAc₂Man₅ nur schlecht als Substrat vom *Leishmania* Enzym akzeptiert zu werden, nachdem nur eine Steigerung von 15 % zu verzeichnen ist. Somit lässt sich bisher für *L.m.*2191 formulieren, dass das Stt3-Homolog aus diesem Organismus keine Substratspezifität ab DolPP-GlcNAc₂Man₆ bis hin zu höher mannosylierten LLOs besitzt, jedoch glukosyierte Oligosaccharid nicht als Substrat erkennt. Zieht man nun die Ergebnisse der Messreihe "- *L.m.*2191" hinzu, so erkennt man auch hier die gleiche Tendenz: Benutzt man Chitobiose oder DolPP-GlcNAc₂Man₅ als Donor, ist in etwa die gleiche Transferrate wie für den OST-Komplex aus Hefe ("+ Vektor") zu beobachten. Bei Angebot von DolPP-GlcNAc₂Man₆ bzw. DolPP-GlcNAc₂Man₉ hingegen ist eine deutliche Steigerung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp ("+ Vektor") zu verzeichnen. Ist *L.m.*2191 in Anwesenheit eines intakten OST-Komplexes vorhanden, beträgt die Transferrate für DolPP-GlcNAc₂Man₆ 173 %, ist das endogene Stt3 reprimiert, sinkt der Wert auf 151 %. Ähnlich verhält es sich für DolPP-GlcNAc₂Man₉, mit dem die Aktivität von 202 auf 172 % sinkt. Nachdem frühere Experimente zeigten, dass sobald intaktes Hefe-Stt3 vorhanden ist, dieses einem weniger funktionellen bevorzugt in den OST-Komplex eingebaut

ERGEBNISSE und DISKUSSION

wird (Diplomarbeit, 2003), könnte man im Falle von "+ *L.m.2191"* spekulieren, dass *L.m.2191* das Hefe-Homolog nicht verdrängen kann und alle Komplexe nur *S.c.Stt3* enthalten. Das würde bedeuten, dass die Steigerung von z.B. 100 auf 202 % (vgl. "+ Vektor" mit "+ *L.m.2191"*) mit DolPP-GlcNAc₂Man₉ aus der Aktivität des nicht im OST-Komplex vorliegenden *L.m.2191* resultiert. Ist aufgrund der Repression von *S.c.Stt3* aber kein intaktes Hefe-Stt3 vorhanden, könnte *L.m.2191* in den Komplex eingebaut werden. Vergleicht man die Aktivitäten mit DolPP-GlcNAc₂Man₉, erreicht *L.m.2191* allein ("- *L.m.2191"*) nur 172 % der 202 %, wenn zusätzlich intakter OST-Komplex vorhanden ist. Sollte protozoisches Stt3 in den Komplex rekrutiert werden und würde dieses seine substratunspezifische Eigenschaft dort beibehalten, würde man in etwa die gleiche Transferrate erwarten. Daher könnte eine Erklärung sein, dass nur ein Teil des freien *L.m.2191* in den Komplex rekrutiert wird, dort jedoch der Substratspezifität der Oligosaccharyltransferase unterworfen ist. Somit würden kürzerkettige Substrate mit geringerer Effizienz übertragen, was der um 30 % reduzierten Rate entsprechen würde bzw. das durch den Einbau fehlende freie, aktive *L.m.Stt3* würde sich in einer Reduktion des Transfers deutlich machen. Untermauert wird diese Interpretation durch Vergleich der Aktivitäten mit dem optimalen Vollängensubstrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃: Ein neben intaktem OST-Komplex exprimierte *L.m.2191* ("+ *L.m.2191"*) zeigt keine Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Wildtyp ("+ Vektor"), was bedeutet, dass das glukosylierte Oligosaccharid vom *L.m.Stt3*-Homolog nicht akzeptiert und übertragen wird. Bei Abgleich der Aktivitäten im reprimierten Zustand ("") von *S.c.Stt3* wird jedoch deutlich, dass durch Co-Expression von *L.m.2191* dennoch eine Steigerung von 51 ("- Vektor") auf 82 % ("- *L.m.2191"*) zu verzeichnen ist. Dies kann eigentlich nur damit erklärt werden, dass *L.m.Stt3* bei Fehlen eines intakten *S.c.Stt3* in den Komplex eingebaut wird und dort die Funktion zumindest teilweise übernehmen kann. Dies unterstreicht, dass die Fähigkeit das dreifach glukosylierte Substrat zu übertragen, vom OST-Komplex, nicht jedoch von der katalytisch aktive *L.m.2191* Untereinheit vermittelt wird. Möglicherweise arretieren andere Komponenten des OST-Komplexes das Vollängenoligosaccharid und positionieren es so, dass es vom Stt3-Homolog aus *L. major* im Komplex übertragen werden kann, wozu das freie Protein alleine nicht in der Lage ist. Nachdem dennoch nur 82 % Aktivität gemessen wurden und auch die *in vivo* Untersuchungen der CPY neben der vollständig glykosylierten Form eine Leiter der unterglykosylierten Banden zeigen (Abb. 24 A und B), blieb die Frage offen, weshalb keine vollständige Komplementation zu beobachten war. Man könnte sich zum einen vorstellen, dass *L.m.2191* nicht so gut wie *S.c.Stt3* in den Komplex passt und durch den Einbau die Interaktionen der Untereinheiten untereinander stört, was zu einer Reduktion der Aktivität führen könnte. Ebenso könnte das

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Homolog aus *L. major* weniger effizient in den Komplex inkorporiert werden, wodurch weniger Komplexe mit einem funktionellen Homolog besetzt sind und intakt in der ER-Membran vorliegen. Folglich würde die Transferrate sinken, was mit den in Abb. 24 und Tab. 12 dargestellten Ergebnissen im Einklang stünde.

Um zu überprüfen, ob das Enzym aus *Leishmania major* auch *in vivo* kürzere Glykanstrukturen mit gleicher Effizienz überträgt, wurde der Glykosylierungsstatus in Zellen mit Defekten in der Oligosaccharidassemblierung untersucht. Als Stämme wurden die gleichen verwendet, aus denen die radioaktiv markierten Zuckerintermediate für die Aktivitätstests (Tab. 12) gewonnen wurden (siehe Tab. 13).

Stamm	Defekt in	akkumuiertes Oligosaccharid
$\Delta alg3$	Mannosyltransferase; Block bei Man ₅ zu Man ₆	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅
$\Delta alg9$	Mannosyltransferase; Block bei Man ₆ zu Man ₇	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₆
$\Delta alg5$	Bildung von DolP-Glc; Block bei Man ₉ zu Man ₉ Glc ₁	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₉

Tab. 13: Zur *in vivo* Analyse des Glykosylierungsstatus mit *L.m.2191* in Mutanten der Zuckerassemblierung verwendete Stämme.

Die Stämme $\Delta alg3$ und $\Delta alg9$ enthalten jeweils einen Defekt in einer Mannosyltransferase, der zur Akkumulation von DolPP-GlcNAc₂Man₅ bzw. DolPP-GlcNAc₂Man₆ führt. In $\Delta alg5$ hingegen liegt ein Defekt in der Glukosyltransferase vor, welche die Bildung von DolP-Glc katalysiert. Hierdurch fehlt das Substrat für den Transfer der ersten Glukose auf DolPP-GlcNAc₂Man₉, wodurch selbiges akkumuliert. In diese Stämme wurde das Plasmid pYES Cup1 H-Flag-K mit *L.m.2191* bzw. *L.m.2193* als Negativkontrolle transformiert und nachfolgend die CPY sowie die Membranfraktion auf Expression der homologen Proteine über *Western Blot* untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 A und B dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

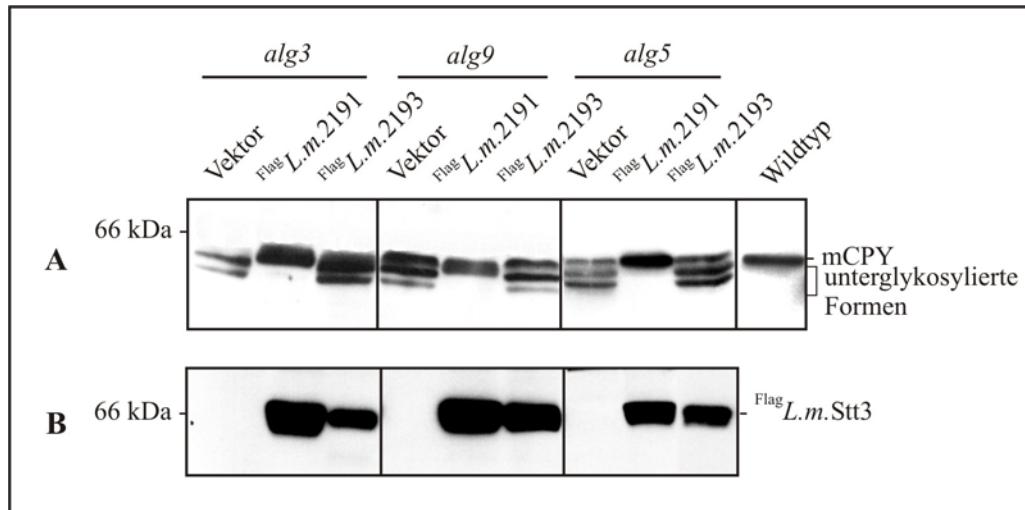


Abb. 26: Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY in Stämmen mit verkürzten Zuckerstrukturen mit *L.m.2191* und *L.m.2193* sowie Expressionsnachweis über *Western Blot*. Von den Stämmen $\Delta alg3$, $\Delta alg9$ und $\Delta alg5$ mit Leervektor als Kontrolle, sowie *L.m.2191* und *L.m.2193* in pYES Cup1 H-Flag-K wurden Zellen bis zu einer OD_{600} von 2-4 in Selektivmedium mit 0.5 mM Kupfersulfat bei 25 °C angezogen. Von den präparierten Membranen wurde die CPY im Überstand durch Dekoration mit anti-CPY Antikörper (A) untersucht, in der Membranfraktion wurde die Expression der jeweiligen Proteine mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers nachgewiesen.

Die Untersuchungen der CPY bestätigen die Ergebnisse des OST-Aktivitätstests (Tab. 12). Wie aus Abb. 26 A ersichtlich, findet man bei Expression von *L.m.2191* in allen drei Mutanten die mature Form der CPY. Die Spur, in welcher der Extrakt des Wildtyps aufgetragen wurde, zeigt ebenfalls die vierfach glykosylierte CPY aus einem Stamm, in welchem GlcNAc₂Man₉Glc₃ vorhanden ist, bei ca. 61 kDa. Da in $\Delta alg3$ und $\Delta alg9$ nur verkürzte LLOs vorhanden sind, laufen die Banden der maturen Form niedriger als die mit dem Vollängenoligosaccharid modifizierte CPY. Ein Beweis, dass *L.m.2191* auch *in vivo* keine Substratspezifität besitzt, und Zucker der Zusammensetzung GlcNAc₂Man₅₋₉ gleich effizient überträgt. Wie der Vergleich mit leerem Vektor als auch dem inaktiven *L.m.2193* zeigt, ist der OST-Komplex der Hefe trotz intaktem *S.c. Stt3* nicht in der Lage, in diesen Mutanten kürzere Ketten effizient zu transferieren und die Unterglykosylierung zu supprimieren. Diese ist umso stärker ausgeprägt, je kürzer die Ketten sind, d.h. $\Delta alg3$ zeigt die stärkste, wohingegen in $\Delta alg5$ mit GlcNAc₂Man₉ neben der ein- und zweifach glykosylierten Form die mature CPY auch ohne *L.m.2191* detektierbar ist. Gleichsam wie im Falle des Aktivitätstests mit "+ *L.m. 2191*", ist hier neben dem protozoischen Stt3 auch intakter Komplex vorhanden, weshalb die beobachtete Komplementation auf Aktivität des Homologs aus *L. major* beruhen muss. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *L.m.2191* in *Saccharomyces cerevisiae* die Fähigkeit generiert, auch suboptimale LLOs mit hoher Effizienz zu übertragen.

2.3.5 Veränderte Substratspezifität durch außerhalb des OST-Komplexes lokalisiertes L.m.2191

Nachdem bislang nur spekuliert werden konnte, ob das Stt3-Homolog aus *L. major* in den Komplex eingebaut wird, sollte eine Analyse des OST-Komplexes mit Hilfe einer *Blue Native* Elektrophorese Aufschluss bringen. Diese bietet die Möglichkeit, Proteinkomplexe in ihrem nativen Zustand zu untersuchen. Für den OST-Komplex aus *S. cerevisiae* konnte bereits gezeigt werden, dass der Komplex ein apparentes, natives Molekulargewicht von 250 kDa besitzt, was einer stöchiometrischen Zusammensetzung von 1:1 entspricht (Knauer und Lehle, 1999). Nachfolgend sollten nun sowohl für *L.m.2191* als auch das inaktive *Pendant L.m.2193* die Lokalisation bei An- und Abschaltung des endogenen Stt3 determiniert werden. Um die Ergebnisse in einen direkten Zusammenhang bringen zu können und um Präparationsfehler bei Isolierung der Rohmembranen auszuschließen, wurden dieselben Membranpräparate benutzt, welche im OST-Aktivitätstest Einsatz fanden (Tab. 11).

Nach Solubilisierung mit dem milden Detergens Digitonin wurden Aliquots auf ein 4-16 %iges Gradientengel aufgetragen und der Lauf unter Kühlung durchgeführt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde der *Blot* zur Detektion von ^{Flag}*L.m.2191* und ^{Flag}*L.m.2193* mit einem anti-Flag Antikörper dekoriert. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt.

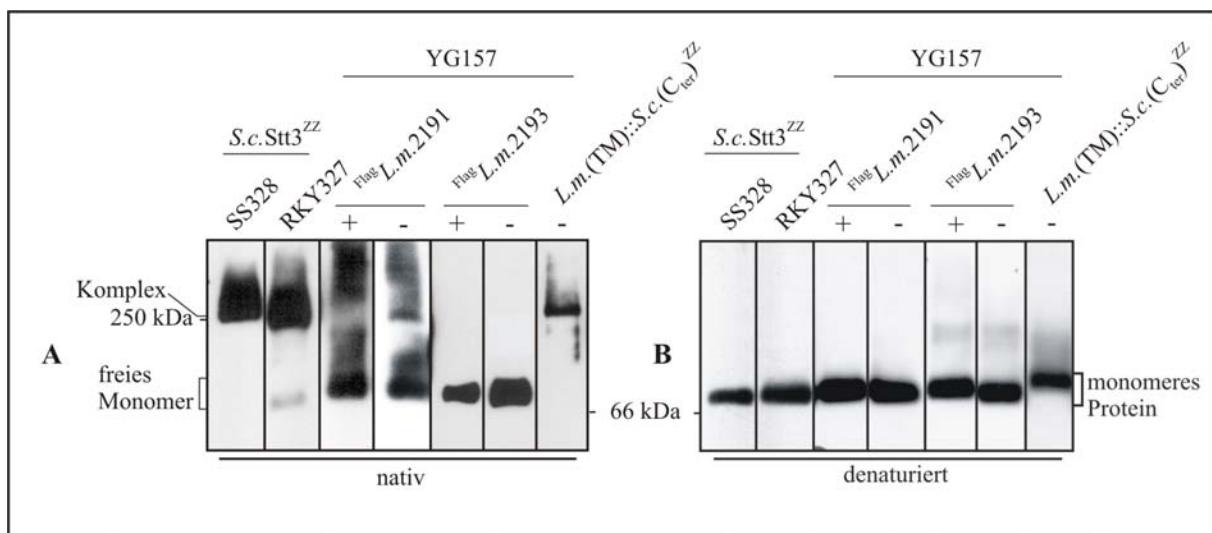


Abb. 20: Blue Native Analyse von Stt3-Homologen aus *L. major* in YG157 sowie des Fusionskonstrukts *L.m.(TM)::S.c.(C_{ter})^{ZZ}* und Kontrollen mit *S.c.Stt3*. Die Auftrennung digitoninsolubilisierter Membranen erfolgte in einem 4-16 % Bis-Tris Gel (Invitrogen). Proben zur denaturierten Analyse wurden vor Auftrag mit 1 % SDS (w/v) für 15 min bei 45°C inkubiert. "+" kennzeichnet die Expression, "-" hingegen die Repression des endogenen Stt3 im Stamm YG157. Als Kontrolle wurden Proben der Stämme SS328 und RKY327 aufgetragen, in welchen das genomisch codierte Stt3 mit einem Protein A-Epitop markiert ist. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde zunächst mit anti-Flag Antikörper dekoriert, welcher an ^{Flag}*L.m.2191* und ^{Flag}*L.m.2193* bindet. Als 2. Antikörper wurde ein monoklonaler anti-mouse IgG benutzt, mit welchem zudem die Protein A-markierten Varianten detektiert werden konnten.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Wie zu erwarten, zeigt die Kontrolle des Stammes SS328 Stt3^{ZZ} eine Bande bei ca. 250 kDa, was dem charakteristischen Laufverhalten des Komplexes entspricht. Der Stamm RKY327, eine Doppeldisruptante in den Genen *OST3* und *OST6*, zwei nicht essentielle Untereinheiten der OST, zeigt einen *Shift* zu geringerem Molekulargewicht, was dem Fehlen der beiden Genprodukte entspricht. Ferner ist eine schwache Bande auf Höhe des monomeren Stt3^{ZZ} zu beobachten, was dafür spricht, dass der Komplex instabil und ein Bruchteil zerfallen ist. Betrachtet man nun die Situation bei Expression von *S.c.* Stt3 und *L.m.*2191 ("+" Flag *L.m.*2191), so ist nur eine Bande auf Höhe des monomeren Homolog aus *L. major* zu erkennen (Abb. 27 A). Um die molekularen Massen der monomeren Proteine zu erfahren, wurde eine *Blue Native* Elektrophorese durchgeführt, in welcher dieselben Solubilisate aus Abb. 27 A denaturiert aufgetragen wurden (Abb. 27 B). Der Vergleich zeigt, dass es sich bei der Bande von "+" Flag *L.m.*2191 tatsächlich um das singuläre Protein 2191 aus *L. major* handelt. Ist das endogene Stt3 in YG157 reprimiert ("-"), ist als dominante Bande wieder nur die monomere Form zu erkennen. Darüber hinaus findet man jedoch ein sehr schwaches Signal auf Höhe des Komplexes. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutungen aus 2.3.2 und 2.3.4, dass *L.m.*2191 nur bei Abschaltung des chromosomalen Stt3 minimal in den Komplex inkorporiert wird. Ist intakter OST-Komplex mit *S.c.* Stt3 vorhanden, liegt das protozoische Homolog nur in freier Form vor. Bei Repression von Stt3 hingegen wird ein Bruchteil von *L.m.*2191 in den Komplex rekrutiert, der meiste Anteil jedoch bleibt als Monomer in der Membran. Somit kann formuliert werden, dass das Stt3 -Homolog aus *L. major* in Hefe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* katalytisch aktiv ist. Bei Co-Expression mit *S.c.* Stt3 liegt es in monomerer Form in der ER-Membran vor, wo es ohne Substratspezifität Oligosaccharide von ihrem Dolicholanker auf ausgesuchte Sequons transferiert. Hierbei wird das für *S. cerevisiae* optimale Substrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ jedoch nicht akzeptiert und übertragen. Ist aufgrund von Repression des endogenen Stt3 defekte Oligosaccharyltransferase vorhanden, wird ein kleiner Prozentsatz des freien *L.m.*2191 in den Komplex rekrutiert. Hier integriert, wird wieder aktives OST-Enzym generiert, bedeutender jedoch ist, dass das inkorporierte *L.m.* Stt3 durch den Komplex die Fähigkeit erlangt, das Vollängensubstrat zu übertragen. Somit ist die Eigenschaft, nur das dreifach glukosylierte Oligosaccharid zu transferieren durch den Komplex vermittelt, nicht jedoch von der katalytisch aktiven Untereinheit Stt3 .

Die Analyse des *in vivo* und *in vitro* inaktiven *L.m.*2193 zeigt, dass weder bei Expression noch bei Repression von *S.c.* Stt3 Protein im Komplex zu finden ist, in beiden Fällen findet man nur die monomere Form (Abb. 27 A und B). Dies könnte bedeuten, dass *L.m.*2193 eine andere Konformation als *L.m.*2191 besitzt. Weshalb es auch außerhalb der OST als einzelnes

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Protein nicht aktiv ist, bleibt jedoch unklar. Wie in Abb. 20 gezeigt, divergiert *L.m.*2193 in einigen Bereichen stark von der Sequenz der komplementierenden artverwandten Isoformen. Ebenso bleibt unklar, weshalb nur ein Bruchteil von *L.m.*2191 in den Komplex eingebaut wird. Wie *in vitro* Messungen der Aktivität mit DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ (Tab. 12) in Kombination mit *Blue Native* Analysen zeigten, ist das inkorporierte *L.m.*Stt3 zur Übertragung fähig, folglich muss es strukturell in den Komplex passen. Doch scheint die Struktur zumindest minimal abweichend von *S.c.*Stt3 zu sein, da ein C-terminal epitopmarkiertes *L.m.*2191^{ZZ} im Gegensatz zu *S.c.*Stt3^{ZZ} nicht aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Um der Frage näher zu kommen, welche Determinanten den Einbau eines Stt3-Proteins in den Komplex bedingen und welche ein aktives Enzym generieren, wurden in 2.6 und 2.7 weitere Untersuchungen unternommen, auf die hier nicht weiter eingangen wird. Auch das in Abb. 27 A und B abgebildete Fusionskonstrukt *L.m.*(TM)::*S.c.*(C_{ter})^{ZZ} wird erst in 2.7 näher diskutiert.

Die Beobachtung, dass präferentieller Transfer von GlcNAc₂Man₉Glc₃ von anderen Komponenten des OST-Komplexes vermittelt wird, unterstützt das von der Arbeitsgruppe um Karaoglu aufgestellte Modell. Sie postulieren, dass die oligomere OST allosterisch reguliert wird, wobei davon ausgegangen wird, dass der Komplex mindestens zwei Substratbindestellen besitzt (Karaoglu *et al.*, 2001). Eine *Site*, welche als regulatorische fungiert, sowie eine andere, welche die eigentlich katalytische *Site* darstellt. Die Bindung eines Substrats an der regulatorischen *Site* zieht eine Konformationsänderung an der katalytischen Bindestelle nach sich, wodurch sich deren Substrataffinität ändert. Ist ein heterogenes Gemisch an unterschiedlich langen Oligosacchariden vorhanden und bindet DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ an die regulatorische *Site*, so erhöht sich die Affinität der katalytischen Bindestelle für den optimalen Volllängendoron um das 10fache. Durch diesen Prozeß der allosterischen Aktivierung wird sichergestellt, dass präferentiell das dreifach glukosyierte Substrat übertragen wird. Ebenso ist ein veränderter K_m für den Peptid-Akzeptor zu verzeichnen: Dieser beträgt bei Angebot von DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ 21.3 µM, bei Präsenz der unglukosylierten Variante hingegen 31.5 µM (Karaoglu *et al.*, 2001). Ähnliches ist auch in Organismen zu beobachten, welche *in vivo* kürzere Ketten übertragen: Ein Vergleich der *in vitro* Donorsubstrat-Nutzung der OST aus *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Cryptococcus neoformans* und *Saccharomyces cerevisiae* mit homogenen und heterogenen Oligosaccharidgemischen ergab, dass die jeweilige Transferase bevorzugt den *in vivo* Oligosacchariddonor überträgt (Kelleher *et al.*, 2007). Im Fall von *T. cruzi*, wie auch in dieser Arbeit für *L. major* bestimmt (Tab. 12), liegt eine Präferenz für DolPP-GlcNAc₂Man₉ im Vergleich zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ vor. Die beiden anderen Protozoen *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* enthalten di-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

vergierend von *T. cruzi* und *L. major* neben Stt3 auch Homologe von Ost1, Ost2 und Wbp1 und bilden einen tetrameren OST-Komplex. Aufgrund des Verlustes einiger ALG Glykosyl- und Glukosyltransferasen, assemblieren diese Protisten *in vivo* DolPP-GlcNAc₂Man₅, wobei *in vitro* DolPP-GlcNAc₂Man_{4,9} mit derselben Rate transferiert werden. Der Pilz *C. neoformans* enthält bis auf Ost5 alle homologen Untereinheiten des Komplexes aus *S. cerevisiae* und Höheren Eukaryoten und assembliert *in vivo* DolPP-GlcNAc₂Man₉. *In vitro* ist eine deutliche Präferenz für DolPP-GlcNAc₂Man_{7,9} zu beobachten, kürzere Oligosaccharide und auch das Vollängensubstrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ werden erheblich langsamer transferiert. Für die OST aus *T. cruzi* und *T. neoformans* konnte gezeigt werden, dass ein nichtoptimaler Donor dreifach reduzierte Bindungsaffinität für das Akzeptorpeptid besitzt, welche für die langsamere Übertragung kürzerer Ketten, folglich der beobachteten Spezifität verantwortlich ist (Kelleher *et al.*, 2007). Somit scheint die Fähigkeit, auf unterschiedliche Oligosaccharidstrukturen mit einer Modulation der Akzeptorsubstratbindeaffinität zu reagieren eine konservierte Eigenschaft eukaryotischer OSTs zu sein, welche der Untereinheit Stt3 zugeschrieben werden kann. In niedermolekularen Komplexen wie aus *E. histolytica* oder der OST aus *T. cruzi*, welche nur aus Stt3 besteht, wird durch Strukturangepassung der katalytischen Untereinheit eine wenig stringente Spezifität für unglukosyliertes Substrat erzielt. In höheren Organismen hingegen, wo alle neun Untereinheiten des Komplexes vorliegen, hat sich eine 2. regulatorische Site entwickelt, welche möglicherweise in Swp1 lokalisiert ist (Kelleher *et al.*, 2007). Diese Bindestelle eröffnet die Möglichkeit, allosterisch Einfluss auf die Katalyse zu nehmen. Es entwickelte sich ein System, in welchem gezielt nur das optimale Substrat DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ übertragen wird und so eine homogene Masse an Glykoproteinen sichert. Vorsichtig kann spekuliert werden, dass sich die N-Glykosylierung zu einer Modifikation entwickelt hat, welche anfangs nur die Pathogenität von *C. jejuni* oder Protozoen wie *L. major* steigerte, im Lauf der Evolution jedoch essentiell und unverzichtbar für Proteinfaltung, -prozessierung und -funktion wurde.

Auch Untersuchungen mit dem Stt3-Homolog PglB aus *C. jejuni* deuten an, dass eine Spezifität für das Vollängenoligosaccharid erst im Laufe der Evolution während der Co-Entwicklung des Komplexes entstanden ist. PglB zeigt breite Subratspezifität und überträgt unterschiedlichste Glykane bei heterologer Expression in *E. coli*, wobei einzig limitierend die Präsenz einer Acetamido-Gruppe an C-2 zu sein scheint (Wacker *et al.*, 2006). Da in *S. cerevisiae* die Notwendigkeit des N-Acetylrestes am ersten dolicholgebundenen Glukosamin in der Katalyse bereits beschrieben ist (Tai und Imperiali, 2001), scheint es sich um einen gemeinsamen Transfermechanismus zu handeln. Da nicht bekannt ist, wie das Modifikations-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

system in *C. jejuni* gelangt ist, handelt es sich möglicherweise um einen rudimentären Vorläufer der N-Glykosylierung, der sich im Laufe der Evolution spezifiziert hat. Wird im Eubakterium *C. jejuni* noch nahezu jedes Oligosaccharid mit einer 2-Acetamidogruppe übertragen, erkennen Protisten wie *L. major* nur dolicholgebundene Zucker der Zusammensetzung DolPP-GlcNAc₂Man₄₋₉ als Substrat an. Durch Entwicklung der komplexen, heterooligomeren OST in Höheren Eukaryoten schließlich differenzierte sich die Spezifität zu DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃.

2.4 Untersuchungen zum Stt3-A aus *Homo sapiens*

2.4.1 *Homo sapiens* codiert für ein hoch konserviertes Stt3-Homolog Stt3-A

Das Stt3 aus Mensch ist das im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Homologen zu *S.c.*Stt3 das am höchsten konservierte. Wie sich im Laufe der Sequenzierung verschiedener Säugergenome herausstellte, besitzen diese Organismen zwei Isoformen (Kelleher et al., 2003). Untersuchungen zeigten, dass multizelluläre Eukaryoten, angefangen von *D. melanogaster* über *M. musculus* bis hin zu *Homo sapiens* zwei unterschiedliche Versionen von Stt3 exprimieren, welche in Stt3-A und Stt3-B Subtypen unterteilt werden. Bereits in der Einleitung erwähnt, unterscheiden sich die Isoformen durch Insertionen und Extensionen voneinander (Abb. 13). Für Stt3 aus Mensch wurde gezeigt, dass die Inkorporation der beiden Isoformen in den OST-Komplex zu unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften führt. Die Isoformen werden zwar in allen Geweben exprimiert, jedoch zu einem unterschiedlichen Anteil. Komplexe mit Stt3-A sind aktiver und zeigen größere Selektivität für das vollständig glykosyierte Oligosaccharid GlcNAc₂Man₉Glc₃, mit Stt3-B hingegen wird ein weniger aktiver, jedoch auch weniger selektiver OST-Komplex gebildet. Durch unterschiedliche Expressionslevel ist es Zellen aus Säugern nun möglich, zusätzlich den Grad an Glykosylierung und auch die Länge der transferierten Oligosaccharide zu steuern, wodurch eine gewebsspezifische Glykan-Heterogenität hergestellt wird. Durch diese Isoformen besitzen mehrzellige, Höhere Eukaryoten nun zusätzlich zur allosterischen Regulation die Möglichkeit, regulierend auf die N-Glykosylierung einzuwirken.

Da es kompliziert ist, menschliche Gene bzw. überhaupt in Introns und Exons angeordnete Gene zu amplifizieren, wurde die cDNA von *H.s.*Stt3-A vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung RZPD (Berlin) bezogen. Da von Stt3-B kein Vollängenkonstrukt, sondern nur die C-terminale, lösliche Domäne erhältlich ist, wurde nur mit der Isoform *H.s.*Stt3-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

A gearbeitet. Das Proteinsequenzalignment von Stt3-A und *S.c.*Stt3 zeigt über weite Strecken identische Sequenz, wobei die Gesamtidentität 54 % beträgt (Abb. 28).

H.s.Stt3-A	MTKFGFLRLSYEKQDILKLLIILSMAAVLSESTRLFAVLRFESVTHEFDPYFNRYRITREIAEEGFYKFHNWFDDRAWYPL	80
S.c.Stt3	..MGSDRSCVLSVFCQILKLVIFVAIFGAIISSRLFAVLFKESVTHEFDPNFNRYRATKYLVNNFSFYKEFLNWFDDETWYPL	78
H.s.Stt3-A	GRIIGGTIVPGLMITSAAIYHVJHFFHIT.IDIRNVCVFLAPLFSFTTIVTYHLTKEDKDAGGLAAAMIAWPGYIS	159
S.c.Stt3	GRVTGGTIVPGLMITSAAFIWHAIFRNWLGLIDIRNVCVLFAPLFSGVTAWATYEFTEKTDASAGLAAAGETIAWPGYIS	158
H.s.Stt3-A	RSVAGSYDNEGIAIFCMLLTYYMWIKAVKTGSICWAACALAYFYMVSSWGGYVFLINLIPHLHVVLVIMLTGRSHRIYVA	239
S.c.Stt3	RSVAGSYDNEAIAITLLMVTFMFWIKAQKTGSIMHATCAALEFYFYMSAWGGYVFITNLIPHLHVFLILMGRYSSKLYSA	238
H.s.Stt3-A	YCTVYCLGIIISMQISFVGFCPVVISSEHMAAFGVFGICQIHAFDYLRSKLNPQQFEVLFRSVISEVGFVLLTVGALLML	319
S.c.Stt3	YITTWYAIITVVASMQISFVGFLPIRSNDHMAALGVFGLIQIVAECDFVKQQISTAKFKVIMMMSLFLILVLGVVGLSALTY	318
H.s.Stt3-A	TCKISPWTGRFYSLIDPSYAKNNIPIIASVSEHQPTIWSSYYFDLQLLVMFFVGLLYYCSENLSDARIFIIIMCVTSMYF	399
S.c.Stt3	MGLIAPWTGRFYSLIDTNYAKIHIFIIASVSEHQPVSWPAFFDTFHFLIWIFPAGVFLIELDLKDEHFVVIAMSVLCSYF	398
H.s.Stt3-A	SAMVMVRLMIVLAPVVICILSGIGVSQVLSTIMKNLDISKPDKSKKQQDSTYPIKNEVASGMILVMAFFLITYTFHSTWVT	479
S.c.Stt3	AGVMVRMLMTLTPVIVCSAAVAISKIFDIYLDFKTSDRKYAIKPAAALLAKLIVSGSFIFYLYLFV.....FHSTWVT	470
H.s.Stt3-A	SEAYSSPSIVLSARGGDGSRIIFDDFREAYYWLRHNTFEDAKVMSWWWDYGYQITAMAANRTILVDNNNTWNNTHSRVGOAM	559
S.c.Stt3	RTAYSSPSVLPSPQTEDGKLAIIIDDFREAYYWLRVMSDEDSKVAAWWWDYGYQIGGMAADRTLVDNNNTWNNTHIAIVGKAM	550
H.s.Stt3-A	ASTEEKAYEIMRELDSYVLVIFGGLTGYSSDDINKFLWMVRIGGSTDTGKHIKENDYYTPTGEFRVDREGSPVLLNOLM	639
S.c.Stt3	ASSEEKSYEILKEHDVYLVVIFGGLIGFGCDDINKFLWMIRISEGIWPEE.IKERDFYTAEGEMYRVDARASETMRNSLL	629
H.s.Stt3-A	YKMCYYRFQVYTEAKRPPGEDRVRNAEIGNKDFE..LDVLEEAYTTEHWLVRVYKVKDLDNRGLSRT	705
S.c.Stt3	YKMSYKDFEPOLNGGQAT...DRVROQMITPLDVPPLDYFDEVFTSENWMVRVYQLKKDAQGRTLDRVGELTRSSTKTR	706
H.s.Stt3-A		
S.c.Stt3	RSIKRPELGLRV	718

Abb. 28: Proteinsequenzalignment von H.s.Stt3-A und S.c.Stt3. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die Sequenzidentität beträgt 54 %.

Auch die Überlagerung der für *S.c.*Stt3 und H.s.Stt3-A vorhergesagten hydrophoben Bereiche im Hydropathie Plot indizieren eine nahezu identische Konformation (Abb. 29).

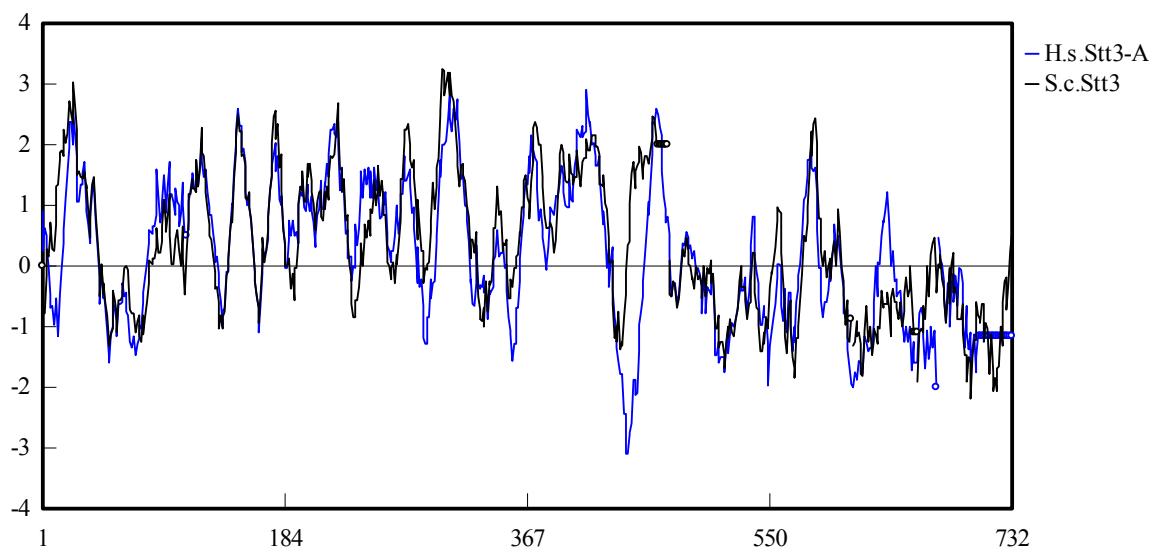


Abb. 29: Hydropathie Plot für S.c.Stt3 und H.s.Stt3-A. S.c.Stt3 ist schwarz, H.s.Stt3-A blau dargestellt.

Aufgrund der hohen Sequenzidentität und auch strukturellen Konservierung, galt Stt3-A als „heissester“ Kandidat, *S.c.*Stt3 funktionell ersetzen zu können. Nachdem der Komplex aus

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Hefe und Mensch nahezu identisch beschaffen ist, einhergehend mit charakteristischen Merkmalen wie allosterische Regulation und Donorspezifität, müsste *H.s.Stt3-A* die Rolle des Hefe-Homologs im Komplex übernehmen können.

2.4.2 *H.s.Stt3-A* kann *S.c.Stt3* funktionell nicht ersetzen

Das Stt3-Homolog wurde in drei unterschiedlichen Varianten analysiert: Durch Klonierung in pVT100-U kann das Protein ohne Epitop über einen konstitutiven Promotor exprimiert werden. Ein Nachweis der Expression war hiermit jedoch nicht möglich. Daher wurde das Gen in den Vektor pVT100-ZZ für ein C-terminales Protein A-Epitop und auch in pYES Cup1 H-Flag-K für ein N-terminales Flag-Epitop kloniert. Hierdurch bestand die Möglichkeit, dass zumindest eines der drei Varianten in katalytisch aktiver Form exprimiert wird. Die Analyse erfolgte wiederum im Stamm YG157, bei dem das chromosomal *S.c.Stt3* an- bzw. abgeschalten werden kann.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

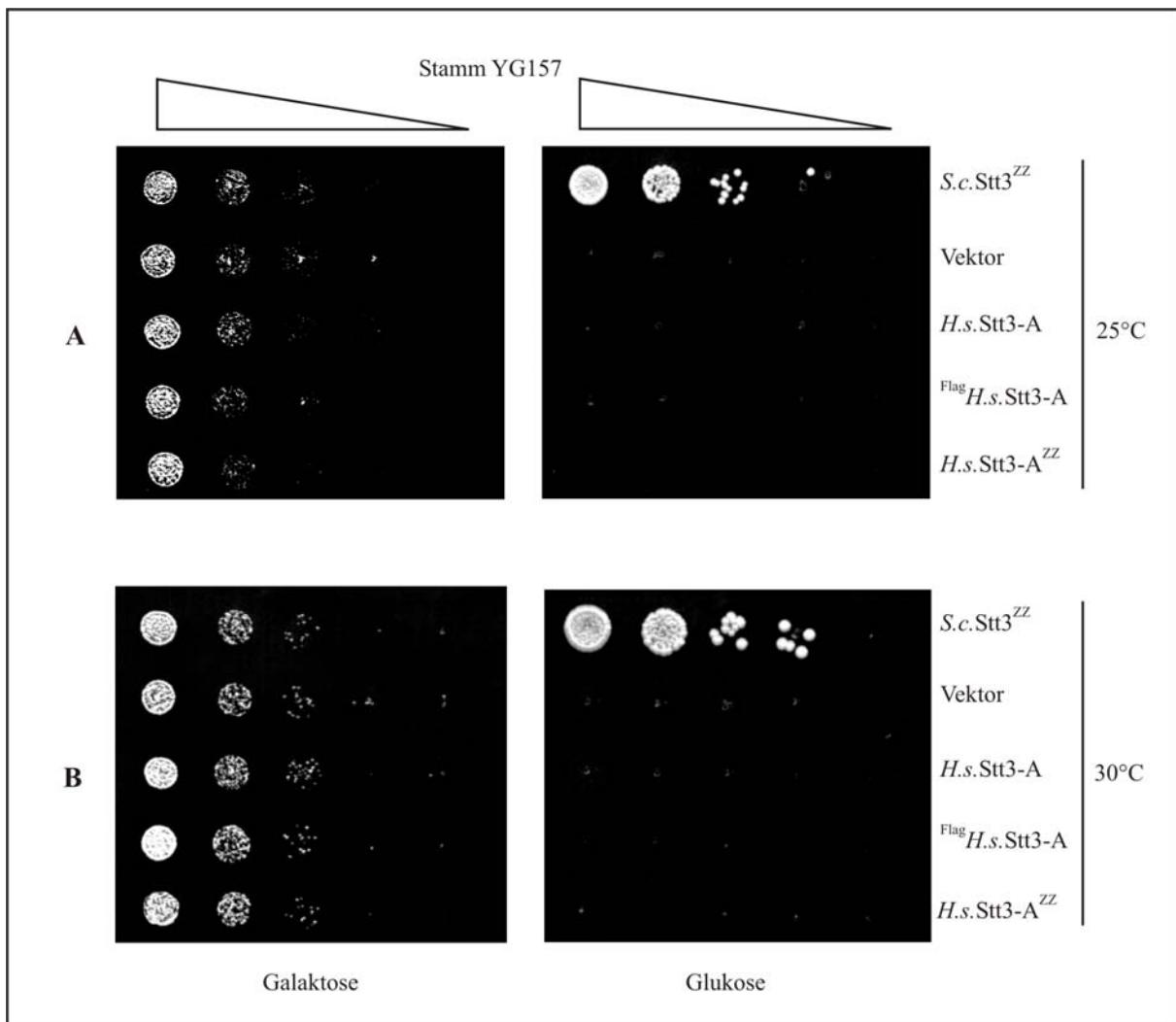


Abb. 30: Wachstumstest von *H.s.Stt3-A* im Stamm YG157. Das Gen *H.s.STT3-A* im Vektor pVT100-U, pVT100-ZZ und pYES Cup1-H-Flag-K wurde im Stamm YG157 bei Expression und Repression des endogenen *S.c.Stt3* exprimiert. Bei der Reihe mit dem pYES-Derivat wurden zur Induktion 0.5 mM Kupfersulfat zugegeben. Von einer in Selektivmedium mit Galaktose angezogenen Kultur bei 30°C wurden Zellen geerntet, mit Minimalmedium mit Glukose gewaschen und aufgenommen. Von einer OD₆₀₀-Einheit wurden 5 Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ hergestellt, je 3 µl auf Vollmedium mit Galaktose bzw. Glukose gebracht und für 3 bzw. 2 Tage bei 25°C (A) bzw. 30°C (B) inkubiert.

Der Wachstumstest zeigt, dass keine der drei Varianten von *H.s.Stt3-A* in der Lage ist, bei Repression des chromosomalen *S.c.Stt3* zu wachsen. Einzig die Kontrolle, das Protein A-markierte *S.c.Stt3^{ZZ}* zeigt Wachstum auf Glukose (Abb. 30 A und B). Auch die Inkubation bei 25°C führte zu keinem Erfolg, die Expression von *H.s.Stt3-A* bei Abwesenheit von *S.c.Stt3* erzeugt einen letalen Phänotyp (Abb. 30 A).

Des Weiteren wurde die CPY in diesen Stämmen bezüglich ihres Glykosylierungsstatus untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

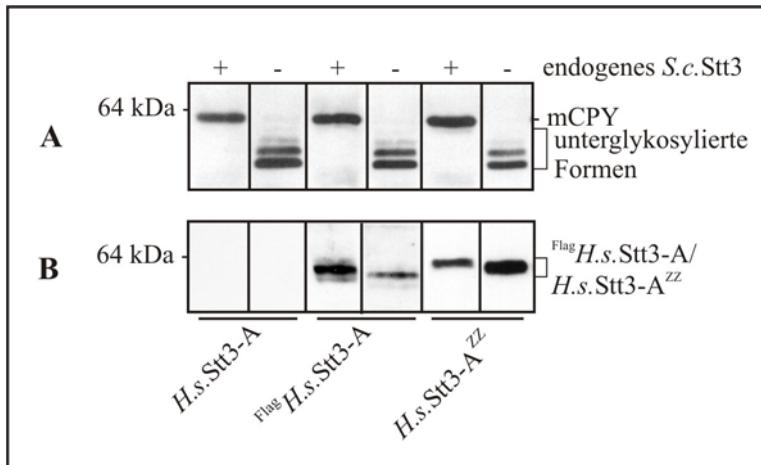


Abb. 31: Analyse von *H.s.Stt3-A* im Stamm YG157. Die Gene im Plasmid pVT100-U, pVT100-ZZ und pYES Cup1-H-Flag-K wurden im Stamm YG157 bei Ex- und Repression von *S.c.Stt3* exprimiert. Die Anzucht der Transformanten mit dem pYES-Derivat erfolgte in Gegenwart von 0.5 mM Kupfersulfat. Von für 8 h in Selektivmedium mit Glukose ("") bzw. Galaktose ("") angezogenen Zellen wurden Membranen präpariert. Die Membran des *Western Blots* mit Cytosol in (A) wurde mit anti-CPY Antikörper auf den Glykosylierungsstatus der CPY dekoriert, (B) mit Membranfraktion mit anti-Flag Antikörper bzw. anti-*mouse* IgG auf die Expression der Proteine. Für das Signal von ^{Flag}*H.s.Stt3-A* musste der Film länger exponiert werden als für das von *H.s.Stt3-A*^{ZZ}.

Die Ergebnisse der *Western Blot* Analyse zeigen, dass trotz Expression von *H.s.Stt3-A*^{ZZ} und ^{Flag}*H.s.Stt3-A* keine Komplementation des Unterglykosylierungsphänotyps bei Abschaltung von *S.c.Stt3* erfolgt (Abb. 31 A). Auch nicht epitopmarkiertes Protein *H.s.Stt3-A* zeigt keine Komplementation bei Abschaltung von *S.c.Stt3*. Da eine Expression nicht nachgewiesen werden kann, wurde zumindest durch Sequenzierung sichergestellt, dass das Gen ohne Fehler kloniert war. Dennoch bleibt fraglich, ob und wie stark das unmarkierte *Stt3-A* exprimiert wird. Dass sich ein Epitop auf die Stärke der Expression oder die Halbwertszeit auswirkt, zeigt der Vergleich von ^{Flag}*H.s.Stt3-A* und *H.s.Stt3-A*^{ZZ}: Das Signal des N-terminal markierten *Stt3*-Homologs ist deutlich schwächer und konnte nur bei längerer Exposition des Röntgenfilms detektiert werden (Abb. 31 B Legende). Man würde sich vorstellen, dass funktionelles Protein durch den Einbau in den Komplex erheblich stabilisiert wird. Im Falle von ^{Flag}*H.s.Stt3-A* deutet das schwache Signal eher darauf hin, dass dieses Protein nicht in den Komplex eingebaut wird, instabil als Monomer in der ER-Membran vorliegt und schnell abgebaut wird. Für das humane *Stt3* kann nahezu ausgeschlossen werden, dass eine Änderung der Glykosylierung bei Expression in Hefe für die Inaktivität verantwortlich ist, wie es für *C.j.PglB* in 2.2.4 spekuliert wird. Untersuchungen von *Stt3-A* und *Stt3-B* in Mensch zeigten, dass beide Isoformen glykosyliert werden (Kelleher *et al.*, 2003). Und auch das veränderte Laufverhalten der Proteine nach Abschaltung von *S.c.Stt3* lässt vermuten, dass *H.s.Stt3-A* bei Expression in Hefe glykosyliert wird (Abb. 31 B).

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Abschließend bleibt zu sagen, dass das Stt3-Homolog *H.s.*Stt3-A trotz seiner hohen Identität zu *S.c.*Stt3 dieses im Komplex nicht ersetzen kann. Da eine nahezu identische Topologie vorhergesagt wird, bleibt fraglich, weshalb das Polypeptid keine Aktivität zeigt. Entweder wird *H.s.*Stt3-A nicht in den Komplex eingebaut oder aber es ist trotz Inkorporation nicht aktiv. In beiden Fällen muss eine Strukturabweichung dafür verantwortlich sein, weshalb kein funktionelles Homolog identifiziert werden konnte. Wie spätere Untersuchungen in Kapitel 2.7 andeuten, scheint das Homolog nicht in den Komplex eingebaut werden zu können. Der Versuch, ^{Flag}*H.s.*Stt3-A über *Blue Native* Analysen inner- oder außerhalb der OST nachzuweisen, schlug leider fehl. Im Gegensatz zum denaturierenden SDS-Gel konnte das Protein im Nativ-gel nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich nimmt das menschliche Homolog eine Konformation ein, in welcher das N-terminale *Flag*-Epitop nicht für den Antikörper zugänglich ist.

2.5 Zusammenfassender Überblick über die untersuchten Stt3-Homologe aus *S. cerevisiae*, *C. jejuni*, *L. major* und *H. sapiens*

Wie in den Kapiteln 2.1 bis 2.4 beschrieben, codieren Organismen vom Eubakterium *C. jejuni* über den Protisten *L. major*, die Hefe *S. cerevisiae* bis hin zum komplexen Eukaryoten *H. sapiens* für eine Oligosaccharyltransferase, die sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihren charakteristischen Eigenschaften unterscheidet. Die N-Glykosylierungsmaschinerie aus *C. jejuni* enthält nur ein zum Stt3-Homologes PglB, das mit breiter Spezifität Oligosaccharide von ihrem Isoprenolanker auf ausgesuchte Sequons Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr überträgt. Die Modifikation scheint hier nicht essentiell zu sein und verleiht dem Eubakterium unterschiedliche Grade an Pathogenität. Im Protisten *L. major* ist bereits eine deutliche Spezifierung geschehen, die OST besteht nur aus der „Untereinheit“ Stt3, dessen codierendes Gen genetische Variabilität enthält, ohne die Aktivität des Proteins zu beeinflussen. Das Enzym überträgt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Oligosaccharide der Zusammensetzung GlcNAc₂Man₅₋₉ vom Lipidanker Dolichol auf das Akzeptorsequon Asn-X-Ser/Thr. In *S. cerevisiae* konnte durch die Aufnahme anderer Untereinheiten eine OST generiert werden, welche durch allosterische Regulation so spezifiziert ist, dass sie präferentiell nur das optimale Substrat GlcNAc₂Man₉Glc₃ überträgt. Im komplexen Eukaryot wie *H. sapiens* sind zusätzlich zwei Isoformen von Stt3 zu finden. OST mit Stt3-A ist hoch selektiv für GlcNAc₂Man₉Glc₃, wo hingegen Komplexe mit Stt3-B weniger aktiv sind und auch kürzere Strukturen übertragen.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Das unterschiedliche Expressionverhältnis in unterschiedlichen Zelltypen verleiht multizellulären Organismen somit die Fähigkeit zu gewebsspezifischer Glykanheterogenität.

Trotz der zum Teil hohen Sequenzidentität und ähnlicher Topologie, war nur das Stt3-Homolog von *L. major* in der Lage, *S.c.*Stt3 zumindest partiell zu ersetzen (Abb. 24). Keines der Homologe aus *C. jejuni* und *H. sapiens* zeigte in Hefe Aktivität (Abb. 14; Abb. 31). In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Expression aller untersuchten Stt3-Homologe zusammenfassend dargestellt.

Wie bereits aus den Ergebnissen von 2.1 bis 2.4 hervorgegangen ist, kann nur das Stt3-Homolog 2191 aus *Leishmania major* die Unterglykosylierung der CPY bei Abschaltung des chromosomalen *S.c.*Stt3 im Stamm YG157 revertieren, jedoch nur bei Expression mit einem N-terminalen *Flag*-Epitop. Weder *C.j.*PglB^{ZZ} noch die unmarkierte, die N-terminal *Flag*- oder C-terminal Protein A-epitopmarkierte Variante von *H.s.*Stt3-A ist dazu in der Lage. So zeigt die CPY nur für ^{Flag}*L.m.*2191 und die Kontrollen SS328, ^{Flag}*S.c.*Stt3 und *S.c.*Stt3^{ZZ} die vollständig, vierfach glykosyierte Bande (Abb. 32 B und C). Aufgrund der starken Unterglykosylierung können alle anderen Transformanten auf Platten mit Glukose nicht wachsen (Abb. 32 A).

ERGEBNISSE und DISKUSSION

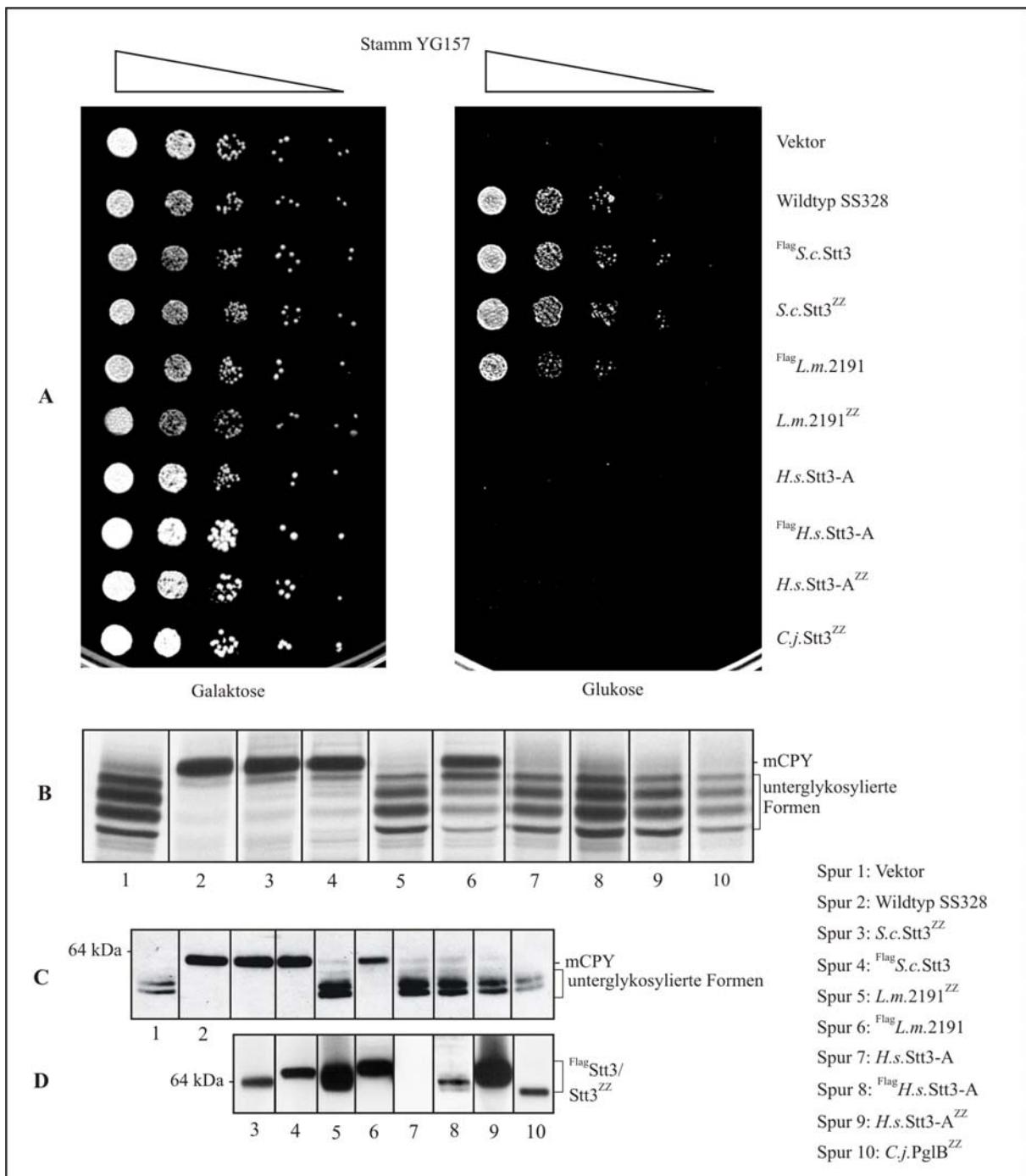


Abb. 32: Analyse der Stt3-Homologe aus *S. cerevisiae*, *L. major*, *H. sapiens* und *C. jejuni* bei Abschaltung von *S.c.Stt3* im Stamm YG157. Die unterschiedlichen Transformanten (Vektor pVT100-ZZ für XX^{ZZ} bzw. pYES Cup1 H-Flag-K für ^{Flag}XX) in YG157 sowie der Wildtypkontrollstamm SS328 wurden in Minimalmedium mit Galaktose und 0.5 mM Kupfersulfat bei 25°C angezogen und mit Glukose-haltigem Minimalmedium gewaschen. Bei Anzucht mit Glukose erfolgte Repression, bei Galaktose Expression des chromosomal Stt3. Für den Tüpfeltest (A) wurden von 1 OD-Einheit 5 Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ hergestellt und je 3 µl auf Vollmedium mit 0.5 mM Kupfersulfat sowie Galaktose bzw. Glukose getüpfelt und bei 25°C inkubiert. Für (B) wurden für 8 h in Glukose-haltigem Medium vorinkubierte Zellen für 45 min mit ³⁵S-Methionin/Cystein markiert und nach Aufarbeitung die CPY über Autoradiographie sichtbar gemacht. Für die Western Blots (C) und (D) wurden von für 8 h abgeschaltenen Zellen Membranen präpariert. In (C) wurde die Membran mit löslichem Extrakt mit anti-CPY Antikörper auf den Status der CPY dekoriert. In (D) wurde in der Membranfraktion befindliches Protein mit Flag-Tag über den ersten Antikörper anti-Flag, ZZ-Epitop über den zweiten anti-mouse IgG detektiert.

2.6 Funktionelle Untersuchung von Fusionsproteinen zwischen Stt3 aus *S. cerevisiae* und Homologen von *C. jejuni*, *L. major* und *H. sapiens*

Nachdem aus den Untersuchungen von 2.2 bis 2.4 hervorging, dass nur das Stt3-Homolog aus *L. major* in der Lage ist, *S.c.*Stt3 funktionell zu ersetzen, stellte sich die Frage nach der Ursache. Da den einzelnen Proteinen eine ähnliche Topologie vorhergesagt wird, sollte ein Einbau in den Komplex prinzipiell möglich sein. Wie jedoch für *L.m.*2191 gezeigt werden konnte, wird nur ein geringer Prozentsatz des protozoischen Homologs in den Komplex eingebaut. Der Großteil der gemessenen Aktivität beruht auf *L.m.*2191, das als Monomer in der ER-Membran residiert (Abb. 27). Eine erste Überlegung war, dass die Transmembranspannen der kritische Faktor sein könnten. Da die OST aus *C. jejuni* und *L. major* nur aus Stt3 besteht, war hier vorstellbar, dass sich eine Tertiärstruktur entwickelt hat, die nicht in den Komplex passt. Im Falle von *H.s.*Stt3-A , welches zu 59 % zu *S.c.*Stt3 identisch ist, ist ebenfalls unklar, weshalb es in Hefe nicht aktiv ist. Der Komplex aus Mensch enthält homologe Proteine zu allen Untereinheiten der OST aus *S. cerevisiae*. Somit sollte eine ähnliche Organisation vorliegen und das menschliche Homolog funktionell an die Stelle von Stt3 im Hefe-Komplex treten können. Daher scheint wahrscheinlich, dass *H.s.*Stt3-A in einer abweichenden Struktur vorliegt, in der es nicht in den Komplex eingebaut werden kann.

In diesem Kapitel wurde daher versucht, durch Domänenau austausch zwischen dem katalytisch aktiven *S.c.*Stt3 und den Homologen von *C. jejuni*, *L. major* und *H. sapiens*, aktive Proteine zu generieren. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Typen von Fusionen durchgeführt, welche in Abb. 33 schematisch dargestellt sind. Die Fusion des C-Terminus eines Homologs an die Transmembranspannen von *S.c.*Stt3 sollte sicherstellen, dass die Fusion analog des Hefe-Stt3 in der ER-Membran verankert ist und über die TM-Spannen gleiche Interaktionen mit anderen Untereinheiten des OST-Komplexes vermittelt (Abb. 33 A). Im zweiten Typus fand die Fusion in der C-terminalen Domäne direkt am konservierten Motiv WWDYG statt, welches in allen Stt3-Homologen zu finden ist (Abb. 33 B). Somit blieb das Motiv erhalten, und nur der Rest des C-Terminus von Stt3 wurde gegen den eines anderen Organismus ausgetauscht. An welcher Position im Protein die einzelnen Fusionen vorgenommen wurden und welche Schnittstellen hierzu verwendet wurden, sind der Plasmid-Liste in 4.2.3 zu entnehmen.

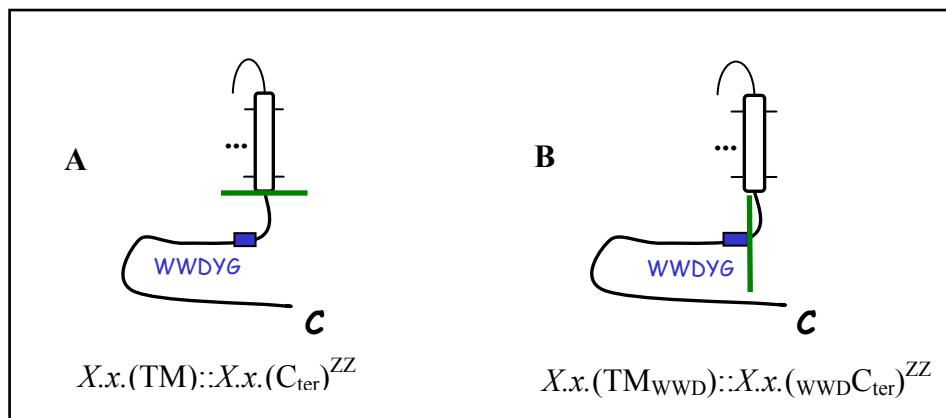


Abb. 33: Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte zwischen homologen Stt3-Proteinen. Stellvertretend für die TM-Domänen ist nur die letzte Transmembranspanne mit mit C-Terminus von Stt3 gezeigt. Die blaue Box indiziert die Lage des konservierten Motivs WWDYG. Der grüne Strich kennzeichnet die Position der Fusion. Sie erfolgte in (A) direkt nach der letzten Transmembranspanne, in (B) hingegen vor dem Motiv WWDYG. Die Konstrukte wurden $X.x.(TM)::X.x.(C_{ter})^{ZZ}$ bzw. $X.x.(TM_{WWD})::X.x.(WWDC_{ter})^{ZZ}$ genannt.

2.6.1 Fusionen zwischen *S.c*.Stt3 und *C.j*.PglB generieren kein aktives Protein

Zunächst wurden Chimäre zwischen *S.c*.Stt3 und *C.j*.PglB gebildet. Die Fusion des ganzen C-Terminus von *C.j*.PglB an die TMspannen von *S.c*.Stt3 wurde in den Vektor pVT100-ZZ kloniert, das entstehende Protein wurde $S.c.(TM)::C.j.(C_{ter})^{ZZ}$ genannt (Abb. 33 A). Das andere Konstrukt, in welchem der C-Terminus von PglB erst ab dem Motiv WWDYG fusioniert wurde (Abb. 33 B), wurde als $S.c.(TM_{WWD})::C.j.(WWDC_{ter})^{ZZ}$ deklariert. Um eine möglichst nahe Angleichung an die Struktur von *S.c*.Stt3 zu erzielen, wurde in beide Fusionen zudem das Glykosylierungsmotiv DNNTWNNT aus Hefe eingeführt. Wie bereits in 2.2.5 diskutiert, ist die Glykosylierung von *S.c*.Stt3 in diesem Sequon essentiell für die Aktivität der OST und eventuell an der Strukturausbildung des C-Terminus bzw. am Einbau in den Komplex beteiligt. Analog 2.2.5, wurde vor Einführung des Motivs das im C-Terminus von *C.j*.PglB gelegene Sequon N₅₃₃QS durch die Mutation S535I eliminiert. Die Fusionen $S.c.(TM)::C.j.(C_{ter})^{ZZ}$ und $S.c.(TM_{WWD})::C.j.(WWDC_{ter})^{ZZ}$ sowie die jeweiligen Varianten mit integriertem Motiv DNNTWNNT wurden im Stamm YG157 untersucht. Nach Abschaltung von *S.c*.Stt3 durch Anzucht auf Glukose-haltigem Medium konnte der Einfluß der Fusionen untersucht werden. Neben Wachstum wurde der Glykosylierungsstatus der CPY untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

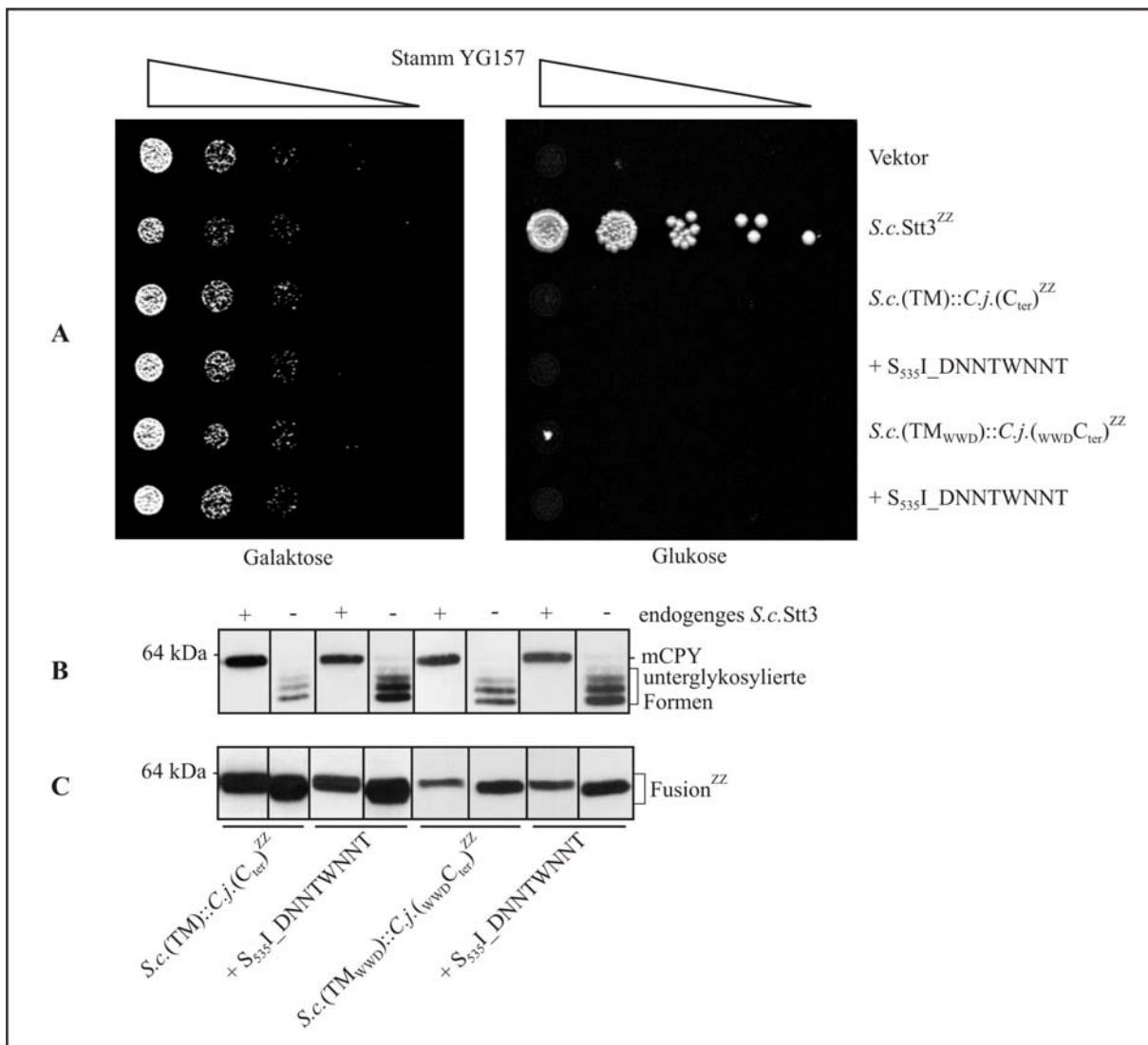


Abb. 34: Analyse der Fusionen *S.c.(TM)::C.j.(C_{ter})^{ZZ}* und *S.c.(TM_{WW})::C.j.(WWDC_{ter})^{ZZ}* im Stamm YG157. Die Zellen wurden in Medium mit Galaktose bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen und nach Waschen in Medium mit Glukose aufgenommen. Für den Wachstumstest (A) wurden von Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ einer OD-Einheit je 3 µl auf Platten mit Galaktose bzw. Glukose getüpfelt und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Für die *Western Blot* Analyse in (B) und (C) wurden Extrakte der für 8 h in Medium mit Galaktose ("+") bzw. Glukose ("−") inkubierten Transformanten präpariert. Die CPY wurde durch anti-CPY (B), die Proteine durch Dekoration mit anti-*mouse* IgG (C) detektiert.

Bereits der Wachstumstest zeigte, dass keine der Fusionen, ob mit oder ohne DNNTWNNT aus *S.c.Stt3* den Phänotyp nach Abschaltung von *S.c.Stt3* revertieren kann (Abb. 34 A). Auch die *Western Blot* Analyse zeigt in allen Fällen nur stark unterglykosylierte Formen von CPY (Abb. 34 B), während auf Galaktose-haltigem Medium aufgrund der Expression von *S.c.Stt3* die mature, vierfach glykosylierte CPY vorhanden ist. Die Untersuchung der Expression aller Fusionskonstrukte zeigt, dass die Proteine gut exprimiert werden. Da bei Abschaltung von *S.c.Stt3* beim Signal aller vier Konstrukte ein *Shift* zu geringerem Molekulargewicht zu beobachten ist, kann gefolgert werden, dass die jeweiligen potentiellen Glykosylierungsstellen, folglich auch das künstlich eingeführte DNNTWNNT, *in vivo* besetzt sind (Abb. 34 C). Aus

ERGEBNISSE und DISKUSSION

diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass auch eine Fusion des C-terminalen Teils von PglB an die Transmembranspannen von *S.c.*Stt3 kein aktives Protein generiert. Möglicherweise können die generierten Chimäre in den Komplex eingebaut werden, sie zeigen jedoch keine katalytische Aktivität. Nachdem für *L.m.*2191 gezeigt werden konnte, dass ein C-terminales Protein A-Epitop die Aktivität stört (Daten nicht gezeigt), wurde die Fusion *S.c.*(TM)::*C.j.*(C_{ter}) und die zugehörige Mutante S535I_DNNTWNNT ebenfalls in den Vektor pYES Cup1 H-Flag-K kloniert. Doch auch die Expression als N-terminal Flag-markiertes Protein führte zu keiner Aktivität (Daten nicht gezeigt). Eine *Blue Native* Analyse könnte Aufschluss geben, ob Konstrukte in die OST inkorporiert werden, insbesondere, ob sich die Einführung von DNNTWNNT positiv auf die Integration auswirkt. Somit könnte geklärt werden, ob das Motiv in *S.c.*Stt3 bzw. dessen Glykosylierung bereits für den Komplexeinbau essentiell ist. In *C.j.*PglB befindet sich das Motiv WWDYG 30 Aminosäuren nach Ende der letzten, postulierten Transmembranpanne, in Hefe hingegen ist es 70 Aminosäuren danach lokalisiert. Dieser Unterschied ist in Konstrukt *S.c.*(TM)::*C.j.*(C_{ter})^{ZZ} gegeben, wo sich das Motiv durch Fusion des C-Terminus von PglB 30 Aminosäuren nach der letzten TMspanne befindet. In *S.c.*(TM_{WWD})::*C.j.*(wwdC_{ter})^{ZZ} hingegen befindet es sich in dem, für das Stt3 der Hefe typischen Abstand von 70 Aminosäuren. Somit kann ausgeschlossen werden, dass dieser Unterschied gravierende Folgen hat. Es erscheint wahrscheinlicher, dass aus der gesamten Struktur kein funktionelles Protein resultiert. Das aktive Zentrum ist durch die Bedingungen in *C. jejuni* (Isoprenol als Membrananker, D/E-X-N-X-S/T als Akzeptorsequon) möglicherweise so verändert, dass es in Hefe nicht aktiv sein kann.

2.6.2 Chimäre aus *S.c.*Stt3 und *L.m.*Stt3 sind katalytisch nicht aktiv

Das Stt3-Homolog 2191 aus *L. major* zeigt bei Expression in Hefe katalytische Aktivität (2.3). Auch wenn die meiste Aktivität von freiem *L.m.*2191 vermittelt wird, wird ein Bruchteil des Proteins in den Komplex eingebaut und ist auch in dieser Form katalytisch aktiv (Abb. 27). Somit war bewiesen, dass das protozoische Homolog eine Struktur besitzt, in der es in den Komplex inkorporiert werden kann. Fusioniert man nun die TM-Spannen von *L.m.*2191 mit dem C-Terminus von *S.c.*Stt3, so würde man erwarten, dass die TM-Domänen, sofern diese das Kriterium für den Komplexeinbau sind, auch das Hybrid in den OST-Komplex dirigieren bzw. einen Einbau ermöglichen. Der so exponierte C-Terminus sollte analog dem Voll-längenprotein *S.c.*Stt3 katalytisch aktiv sein. Gleches müsste für die gegenteilige Fusion der Fall sein, wenn man den C-Terminus von *L.m.*2191 an die TM-Spannen des Hefe-Homologs

ERGEBNISSE und DISKUSSION

fusioniert. Um dies zu überprüfen, wurden Fusionen der TM-Spannen mit dem löslichen C-Terminus (Abb. 33 A) erstellt, benannt mit *S.c.(TM)::L.m.2191(C_{ter})* sowie *L.m.2191(TM)::S.c.(C_{ter})*. Zudem wurde der C-Terminus des inaktiven *L.m.2193* (Abb. 24) an den N-Terminus von *L.m.2191* fusioniert, genannt *L.m.2191(TM)::L.m.2193(C_{ter})*. Dieses Konstrukt sollte Aufschluss geben, ob *L.m.2193* als Vollängenprotein aufgrund von Abweichungen in den Transmembranspannen in Hefe nicht aktiv ist. Ferner wurden alle drei Konstrukte ab dem Motiv WWDYG ausgetauscht (Abb. 33 B). Die Chimäre wurden in den Vektor pVT100-ZZ und pYES Cup1 H-Flag-K kloniert, wodurch sowohl N-terminal *Flag*-, als auch C-terminal Protein A-markierte Proteine exprimiert werden konnten. Die Analyse erfolgte wie üblich im Stamm YG157. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Protein A-epitopmarkierten Proteine sind in Abb. 35 dargestellt.

Die Untersuchungen bei Abschaltung des endogenen *S.c.*Stt3 zeigen, dass erstaunlicherweise keine der Fusionen die Unterglykosylierung von CPY revertieren kann (Abb. 35 B). Aufgrund der starken Unterglykosylierung kann keine der analysierten Transformanten auf Glukose, sprich ohne intaktes *S.c.*Stt3, wachsen (Abb. 35 A). Die Fusionen werden exprimiert und bestätigen bei Vergleich im exprimierten und reprimierten Zustand von *S.c.*Stt3, dass alle der Chimäre glykosyliert werden. Ist die Glykosylierung intakt ("+"), findet man ein Signal bei geringfügig höherem Molekulargewicht als bei Repression von Stt3 ("−"), was darauf hindeutet, dass in der Fusion vorliegende Akzeptorsequons besetzt sind (Abb. 35 C). Wie bereits erwähnt, wurden die Konstrukte auch im pYES-Derivat mit einem N-terminalen *Flag*-Epitop exprimiert. Auch hier zeigten die Analysen dieselben Phänotypen wie in Abb. 35. Die fehlende Aktivität scheint somit nicht von einem störenden Epitop abzuhängen (Daten nicht gezeigt).

Entgegen der Erwartungen, erzeugte der Domänenaustrausch in *L.m.2191(TM)::S.c.(C_{ter})* und *S.c.(TM)::L.m.(C_{ter})* kein funktionelles Protein. Obgleich als Vollängenproteine beide im Komplex aktiv, erzeugt ein Austausch der Transmembranspannen kein aktives Chimär. So bleibt zu folgern, dass durch den Domänenaustrausch die Ausbildung einer funktionellen Tertiärstruktur verhindert wird. Würde die katalytisch aktive Konformation des C-Terminus unabhängig der TM-Spannen entstehen, müssten die Fusionen Aktivität besitzen. Daher scheint in diesen Chimären eine Wechselwirkung gestört zu sein, die so fein auf die einzelnen Stt3-Homologe abgestimmt ist, dass bei Interaktion mit einer fremden Domäne inaktives Protein entsteht.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

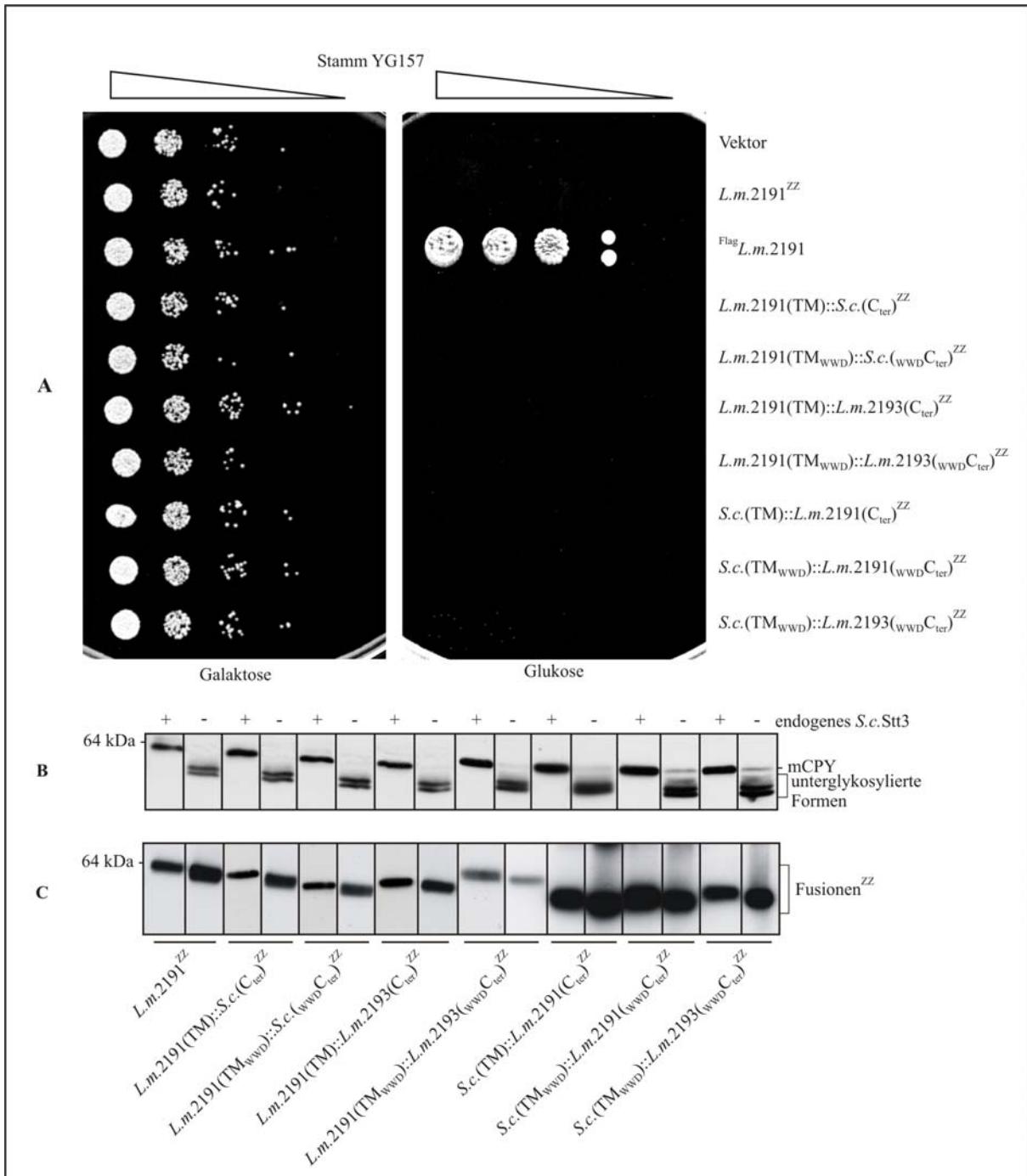


Abb. 35: Analyse der Fusionen aus *S.c.Stt3*, *L.m.2191* und *L.m.2193* im Stamm YG157. Die Fusionen im Vektor pVT100-ZZ wurden bei An- und Abschaltung des endogenen *S.c.Stt3* untersucht. Zellen wurden in Selektivmedium mit Galaktose bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 bei 25°C angezogen und mit Glukose-haltigem Medium gewaschen. Für den Wachstumstest (A) wurden von 1 OD-Einheit 5 Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ hergestellt und je 3 µl auf Vollmedium mit Galaktose bzw. Glukose getüpft und bei 25 °C für 3 Tage inkubiert. Für die Western Blot Analyse wurden von für 8 h abgeschaltenen Zellen Extrakte präpariert und in (B) das Cytosol auf den Glykosylierungsstatus der CPY mit anti-CPY Antikörper untersucht. Die Membranfraktion wurde auf Expression der Fusionen mit anti-*mouse* IgG untersucht (C).

Die Fusionen *L.m.2191(TM)::L.m.2193(C_{ter})* und *L.m.2191(TM_{WW}D)::L.m.2193(WWDC_{ter})* lassen vermuten, dass nicht der N-Terminus von *L.m.2193* für dessen Inaktivität verantwortlich sind. Da die beiden Fusionen an *L.m.2191* kein funktionelles Protein erzeugen, handelt es sich bei *L.m.2193* möglicherweise um ein *per se* inaktives Stt3-Homolog, wie bereits in 2.3.2

ERGEBNISSE und DISKUSSION

vermutet wurde. Wie im Proteinsequenzalignment ersichtlich ist, divergiert *L.m.2193* in der C-terminalen, löslichen Domäne vor allem durch eine Extension ab Aminosäure 694 (Abb. 20). Um zu testen, ob dieser *Spacer* für die Inaktivität des Proteins verantwortlich ist, wurde eine Fusion erstellt, in welchem der C-Terminus von *L.m.2193* ab Aminosäure 719 ohne die Extension an den N-Terminus von *L.m.2191* ab Aminosäure 750 fusioniert wurde, genannt *L.m.2191(TM₇₅₀)::L.m.2193(719C_{ter})*. Doch auch die Expression dieses Chimären im pYES-Derivat zeigte keine Komplementation (Daten nicht gezeigt). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Extension zumindest in der Fusion *L.m.2191(TM₇₅₀)::L.m.2193(719C_{ter})* zu Inaktivität führt.

2.6.3 Domänenauktausche zwischen Stt3 von Hefe und Mensch erzeugen keine funktionellen Proteine

Schließlich wurden die Transmembranspannen des Stt3-Proteins von Hefe und Mensch ausgetauscht. Wie bereits eingangs des Kapitels erwähnt, ist *H.s.Stt3-A* zu fast 60 % identisch zu *S.c.Stt3*. Hydropathie-Plots und Topologievorhersage-Programme deuten an, dass Stt3-A eine nahezu gleiche Konformation wie sein Hefe-Homolog einnimmt. Umso erstaunlicher ist es, dass Stt3-A kein funktionelles Homolog darstellt (Abb. 30 und 31). Durch die Fusion wurde erhofft, marginal störende Unterschiede beseitigen zu können. Sollten diese im N-Terminus lokalisiert sein, müsste *S.c.(TM)::H.s.(C_{ter})* aktiv sein. Sollte hingegen der C-Terminus des humanen Stt3 kritisch für einen Einbau in den Komplex sein, müsste eine Fusion *H.s.(TM)::S.c.(C_{ter})* Aufschluss geben. Daher wurden diese beiden Fusionen in den Vektor pVT100-ZZ und pYES Cup1 H-Flag-K kloniert und nachfolgend im Stamm YG157 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 36 dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

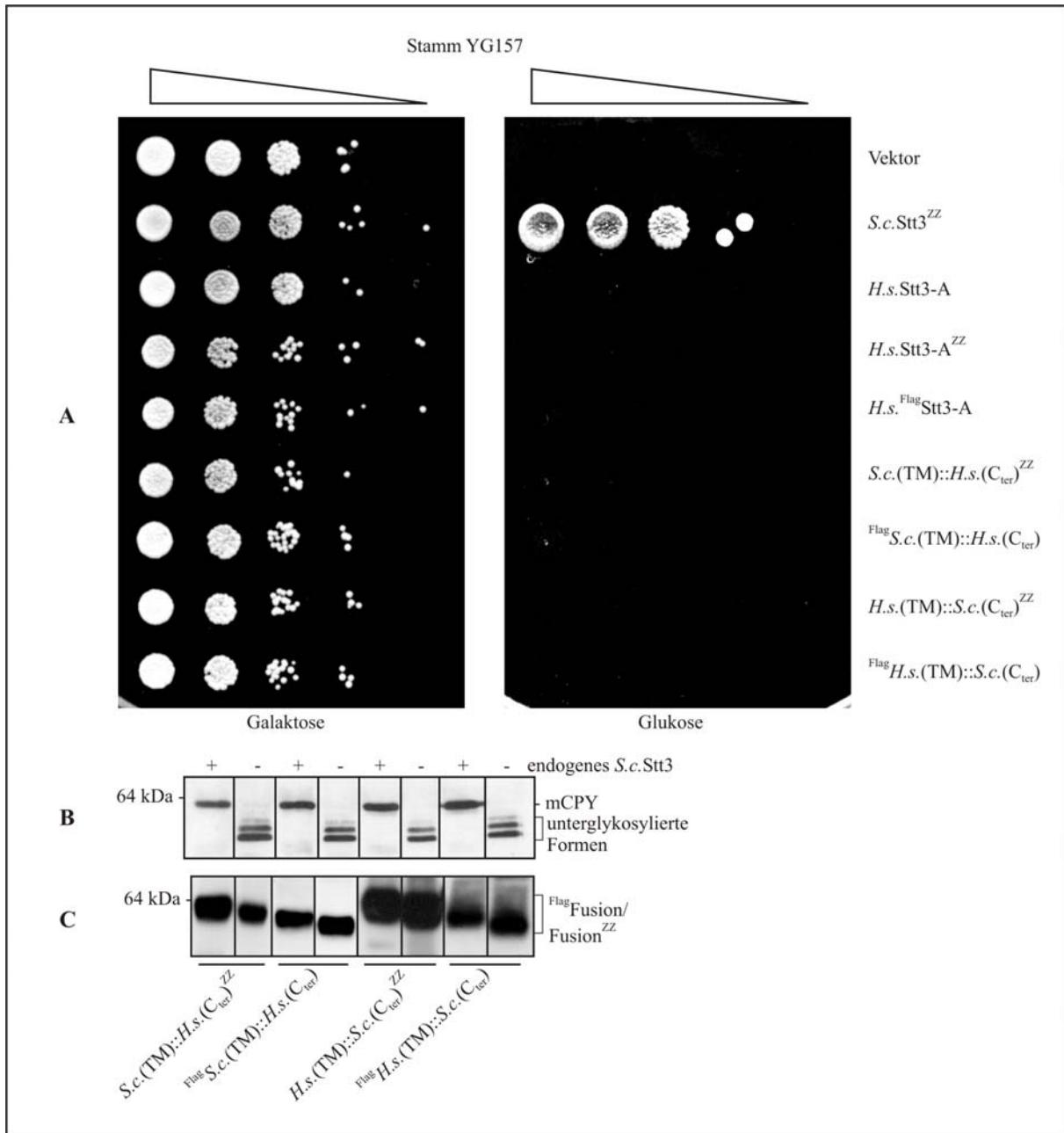


Abb. 36: Analyse der Fusionen *S.c.*(TM)::*H.s.*(C_{ter})^{ZZ} und *H.s.*(TM)::*S.c.*(C_{ter})^{ZZ} im Stamm YG157. Die Fusionen wurden sowohl im Vektor pVT100-ZZ als auch in pYES Cup1 H-Flag-K exprimiert, wobei bei Anzucht in Galaktose-haltigem Medium die Expression ("+"), bei Glukose-Medium die Repression ("−") von *S.c.*Stt3 erfolgte. Die Zellen wurden bei 25°C in Selektivmedium mit Galaktose bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen und mit Medium mit Glukose gewaschen und aufgenommen. Für den Wachstumstest (A) wurde von 1 OD₆₀₀-Einheit 5 Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ hergestellt, je 3 µl auf Vollmedium mit Galaktose/Glukose gebracht und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Für die Western Blot Analyse (B) und (C) wurden Extrakte von für 8 h abgeschalteten Zellen präpariert, der Überstand mit anti-CPY Antikörper auf den Glykosylierungsstatus der CPY überprüft (B) sowie die Membranfraktion auf Expression der Fusionskonstrukte mit anti-Flag Antikörper bzw. anti-mouse IgG (C). Bei Konstrukten mit dem pYES-Vektor wurde zur Induktion des Kupfer-induzierbaren Pro-motors stets 0.5 mM Kupfersulfat zugegeben.

Keines der Konstrukte, ob N-terminal *Flag*-, oder C-terminal Protein A-markiert erzeugt ein funktionelles Protein. Bereits der Wachstumstest auf Glukose-haltigem Medium deutet an, dass Zellen bei Abschaltung von *S.c.*Stt3 trotz Expression von *S.c.*(TM)::*H.s.*(C_{ter}) oder *H.s.*(TM)::*S.c.*(C_{ter}) nicht mehr wachsen können (Abb. 36 A). Auch die Analyse der CPY in

ERGEBNISSE und DISKUSSION

diesen Zellen verdeutlicht die nicht-funktionelle Rolle aller vier Chimäre (Abb. 36 B). Die Proteine werden zwar offensichtlich gut exprimiert, sind jedoch nicht zur Komplementation der *S.c.*Stt3-Defizienz befähigt (Abb. 36 C). *H.s.(TM)::S.c.(C_{ter})* könnte *per se* aktiv sein, aufgrund der TM-Spannen von Mensch jedoch nicht in den Komplex eingebaut werden. Nur ein Nachweis über *Blue Native* Elektrophorese könnte zeigen, ob eines der vier Konstrukte in den OST-Komplex eingebaut wird. Gesichert jedoch ist, dass auch ein Domänenaustrausch dieser stark homologen Proteine kein aktives Protein generiert.

Alle in 2.6 gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die katalytisch aktive Konformation von Stt3 nur durch Interaktion des C- mit dem N-Terminus erreicht wird. Betrachtet man die TM-Spannen und den löslichen C-Terminus als zwei Domänen, deren funktionelle Konformation unabhängig voneinander entsteht, hätte man zumindest in den Fusionen von *L.m.*2191 und *S.c.*Stt3 katalytische Aktivität beobachten müssen. Die innermolekularen Wechselwirkungen scheinen jedoch species-spezifisch zu sein, weshalb ein Domänenaustrausch zwischen Stt3 aus unterschiedlichen Organismen nicht zum Erfolg führt.

2.7 Fusion von *S.c.*Stt3 und *H.s.*Stt3-A auf der Suche nach Determinanten für die Inkorporation von Stt3 in den OST-Komplex

Die Analyse sämtlicher Fusionskonstrukte zeigte, dass keines der Hybride in der Lage war, die funktionelle Rolle von *S.c.*Stt3 innerhalb des OST-Komplexes einzunehmen (2.6). Zu Beginn der Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass eine Organisation der TM-Spannen analog *S.c.*Stt3 für die Integration in den oligomeren Komplex von Nötigkeit ist. Da insbesondere durch die Fusionen von *S.c.*Stt3 mit *L.m.*2191, welche beide *per se* als Vollängenproteine im Komplex aktiv sind, jedoch keine funktionellen Proteine generiert werden konnten (Abb. 35), wird vermutet, dass zur Ausbildung einer funktionellen Tertiärstruktur eine Interaktion des C-Terminus mit dem N-Terminus nötig ist. Daher stellte sich die Frage, inwiefern die Transmembranspannen hieran beteiligt sind und den Einbau eines funktionellen Stt3 erlauben.

2.7.1 Sequenzvergleich von *H.s.*Stt3-A und *S.c.*Stt3 erlaubt die Festlegung der Transmembranspannen und Konstruktion der Fusionen

Um der Fragestellung näher zu kommen, sollten erneut Fusionskonstrukte hergestellt werden, wobei Transmembranspannen von *S.c.*Stt3 vom N-Terminus her mit homologen Bereichen von *Homo sapiens* ausgetauscht wurden. Aufgrund seiner großen Sequenzidentität und -Ähnlichkeit wurde das Homolog aus Mensch gewählt. Zunächst wurde von beiden Organismen

ERGEBNISSE und DISKUSSION

die Topologievorhersage für *H.s.Stt3-A* und *S.c.Stt3* näher beleuchtet. Mit Hilfe unterschiedlicher Programme sowie über Abgleich mit einem experimentell ermittelten Modell der Topologie von *S.c.Stt3* (Abb. 30) konnten für beide Proteine Transmembranspannen prognostiziert werden (Tab. 14).

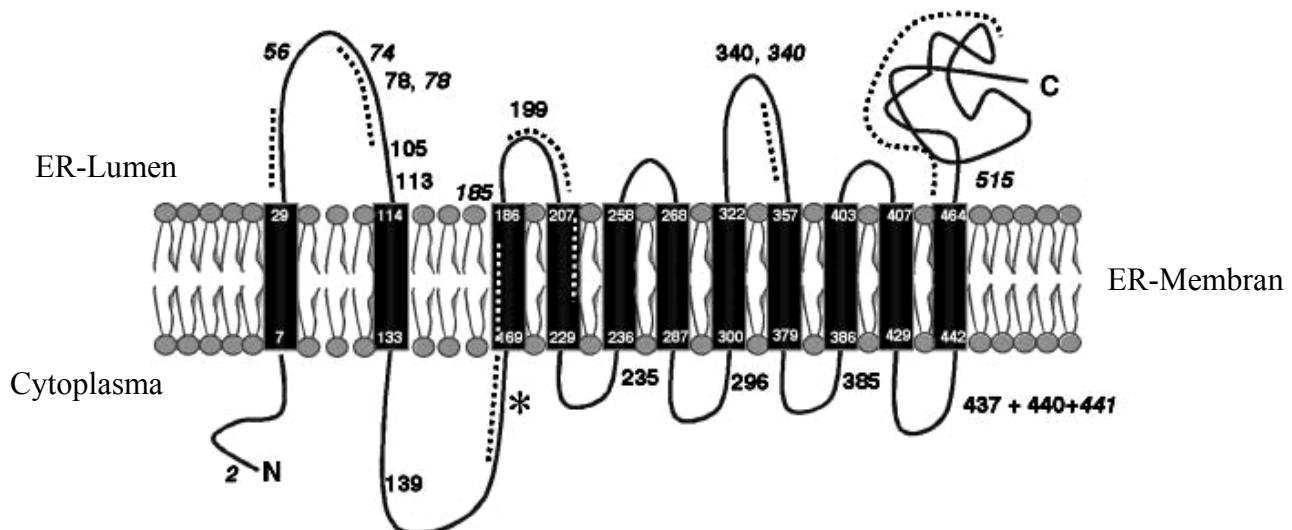


Abb. 37: Topologie-Modell für *S.c.Stt3*. Aus Kim *et al.*, 2005. Experimentell ermittelte Aminosäuren sind in schwarzen, vorhergesagte Enden der Transmembranspannen in weißen Zahlen angegeben. Gestrichelte Linien geben Bereiche an, welche zwischen Maus und Hefe hoch konserviert sind. Der Stern indiziert die Reste 158-168, welche womöglich mit einer Komponente der Pkc1 Kaskade interagieren.

<i>H.s.Stt3-A</i>	TMHMM	Pasteur	TMPred	<i>S.c.Stt3</i>	TMPred	Kim <i>et al.</i> (2005)
2. TM-Spanne	20-39	16-36	20-39		15-37	7-29
	83-105	83-103	83-103		81-101	
	112-131	114-134	114-130		113-129	114-133
	141-163	140-160	141-159		140-158	
	170-187	168-188	168-184		167-183	169-186
	202-224	210-230	206-227		205-226	207-229
7. TM-Spanne	236-258	241-261	236-254		241-259	236-258
	268-286	266-286	262-283		266-285	268-297
	298-320	301-321	302-319		296-315	300-322
	361-383	363-383	360-379		360-380	357-379
	404-426	406-426	406-426		386-403	386-403
	456-478	456-476	456-474		405-428	407-429
					442-464	442-464

Tab. 14: Prognostizierte Transmembranspannen von *H.s.STT3-A* und *S.c.Stt3*. Gezeigt sind die mit Hilfe der Computerprogramme TMHMM, Pasteur und TMPred vorhergesagten Membrandomänen, sowie experimentell ermittelte Daten für das Homolog aus Hefe (aus Kim *et al.*, 2005), wobei sich die Zahlen auf die jeweiligen Aminosäuren beziehen. Die Werte der prognostizierten 2. und 7. Transmembranspanne sind fett rot gedruckt.

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, stimmen die vorhergesagten Transmembranspannen für *H.s.Stt3-A* zwischen den unterschiedlichen Programmen in etwa überein. Vergleicht man die

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Angaben von TMPred für *S.c.Stt3* mit denen für das menschliche Homolog, so sieht man deutlich, dass die Identität zwischen beiden Proteinen so hoch ist, dass die Membrandomänen an etwa der gleichen Position im Protein vorhergesagt werden. Betrachtet man nun die experimentell ermittelten Daten, so fällt auf, dass in Hefe die über Topologievorhersage-Programme prognostizierte 2. und 4. Spanne *in vivo* keine darstellt. Dies sollte auch für das Homolog aus Mensch zutreffen. Daher wurden die prognostizierten TM-Spannen für *H.s.Stt3-A* so gewählt, dass sie mit den experimentell ermittelten Werten von *S.c.Stt3* übereinstimmen (Tab. 14). Um einen ersten Anhaltspunkt über die Bedeutung des N-Terminus hinsichtlich Inkorporation und Funktionalität von *S.c.Stt3* zu erhalten, wurden die Hybride folgendermaßen gewählt: Im Konstrukt *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)* fand eine Fusion in der 2. TM-Spanne statt, im zweiten Chimär *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)* in der 7. Membranspanne. Betrachtet man hierzu die Topologie von *S.c.Stt3* (Abb. 37), bedeutet dies, dass im ersten Hybrid nur der kurze, cytoplasmatische N-Terminus sowie die erste luminaire Domäne von *H.s.Stt3-A* stammen, in zweiten zusätzlich der zweite und dritte ER-lokaliisierte *Loop*. Die Fusion der Konstrukte wurde nun wie in Abb. 38 angegeben gewählt.

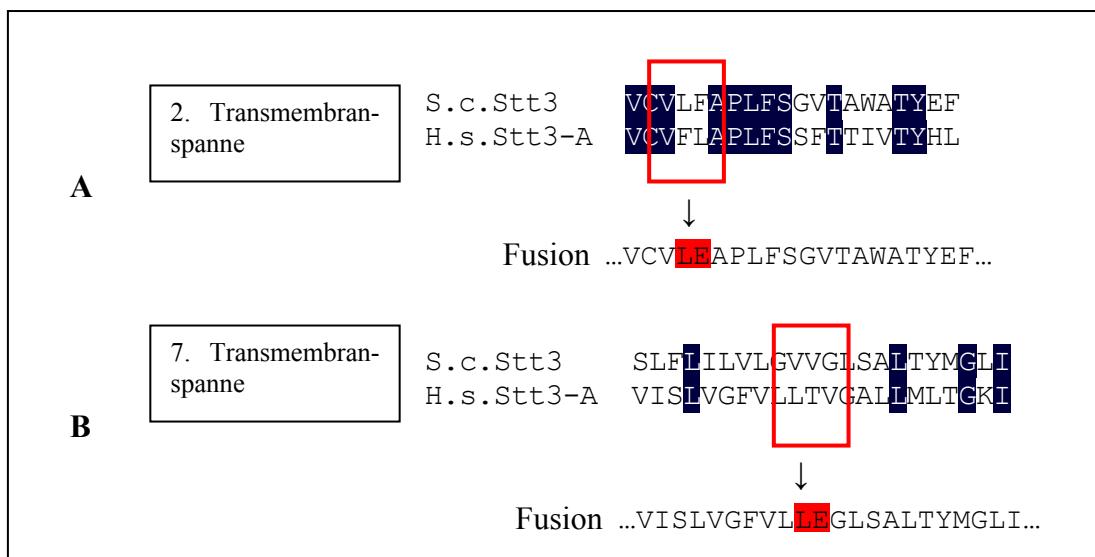


Abb. 38: Sequenz der Fusionskonstrukte zwischen *H.s.Stt3-A* und *S.c.Stt3*. Angegeben ist das *Alignment* der postulierten 2. (A) bzw. der 7. Transmembranspanne (B) von Hefe und Mensch. Über Fusion mit der Schnittstelle *XhoI* wurde jeweils das Sequenzmotiv LE (rot unterlegt) in die Membrandomänen eingebracht. Die resultierende Sequenz der Fusion ist unterhalb des Pfeils angegeben.

Über PCR wurden die einzelnen Fragmente amplifiziert: *H.s.Stt3-A* vom Startcodon an mit 5'-*HindIII* und 3'-*XhoI* bis TM 2 bzw. TM 7, *S.c.Stt3* mit 5'-*XhoI* und 3'-*BamHI* ab TM 2 bzw. TM7 bis zum Ende des Gens. Eine Fusion innerhalb der jeweiligen Membranspannen wurde deshalb gewählt, um die durch die Schnittstelle *XhoI* eingebrachten Aminosäuren LE nicht an der Oberfläche zu exponieren. Hierdurch sollte eine mögliche Interaktion der Loops

ERGEBNISSE und DISKUSSION

mit anderen Untereinheiten des Komplexes so wenig wie möglich beeinträchtigt werden. So wird durch die Schnittstelle in der ersten Fusion hinsichtlich der Sequenz von *S.c.*Stt3 lediglich ein F für ein E getauscht (Abb. 38 A), im zweiten Konstrukt bezüglich Mensch ein T nach einem E, für Hefe erfolgt ein Austausch von VV nach LE (Abb. 38 B). Um das Protein nachzuweisen, wurde C-terminal ein Protein A-Epitop eingeführt. Die Konstrukte wurden als *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ} und *H.s.*(TM₇)::*S.c.*(₇TM)^{ZZ} bezeichnet.

2.7.2 Funktionelle Untersuchungen der Fusionskonstrukte *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ} und *H.s.*(TM₇)::*S.c.*(₇TM)^{ZZ}

Die Analyse der Fusionen erfolgte, analog der anderen Konstrukte, im Stamm YG157, welcher den Galaktose-induzierbaren Promotor genomisch integriert vor *STT3* enthält. Zunächst wurde das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen sowohl in an- als auch im abgeschaltenem Zustand des genomischen *S.c.*Stt3 untersucht.

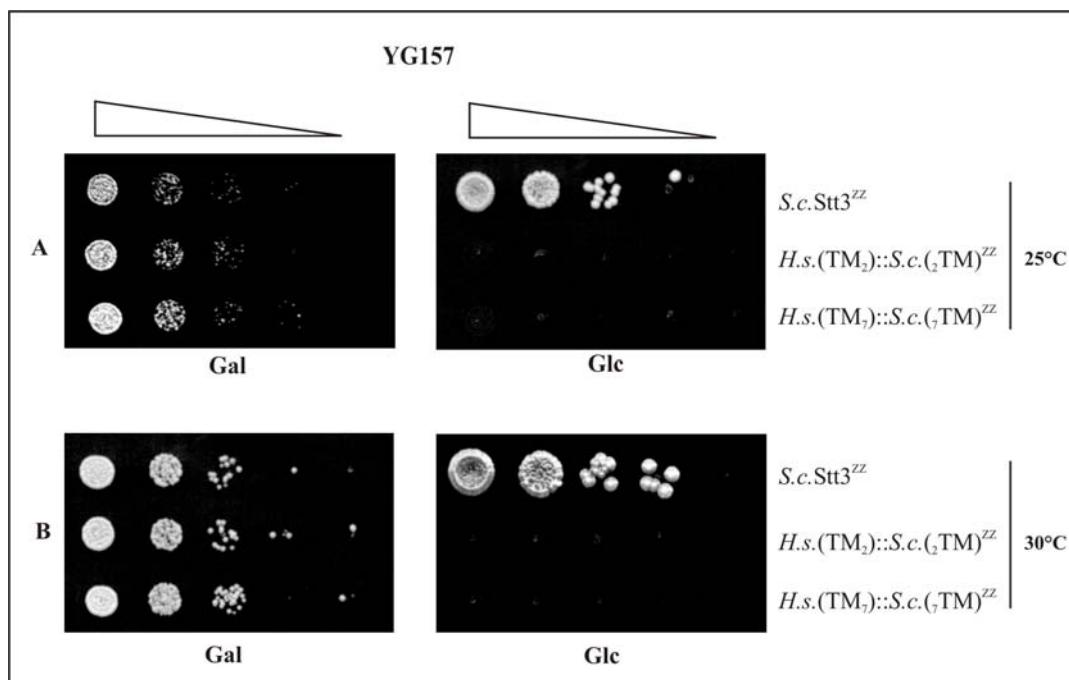


Abb. 39: Wachstumsanalyse der Fusionen im Stamm YG157 bei 25 und 30°C. Die Zellen mit den Fusionen in pVT100-ZZ bzw. Hefe-STT3 als Kontrolle wurden in Minimalmedium mit Galaktose bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen, 1 OD₆₀₀-Einheit geerntet (=10⁷ Zellen/ml) und mit Minimalmedium mit Glukose gewaschen. Von den Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁵ wurden je 3 µl auf Vollmedienplatten mit Galaktose oder Glukose gebracht und für 2 Tage bei 25°C (A) bzw. 30°C (B) inkubiert. Durch Anzucht auf Galaktose erfolgt Expression, auf Glukose hingegen Repression des genomisch codierten *S.c.*Stt3.

Wie der Wachstumstest zeigt, sind die Fusionen nicht in der Lage, eine funktionelle Rolle im OST-Komplex einzunehmen. Wie erwartet, wachsen alle Stämme bei beiden Temperaturen auf Galaktose-Medium, bedingt durch die Expression des endogenen Stt3. Wurde das geno-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

mische Stt3 jedoch auf Glukose reprimiert, zeigt nur das Volllängen-Hefe-Konstrukt Komplementation (Abb. 39 A und B). Sowohl *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* als auch *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* weisen bei 25 (Abb. 39 A) und 30°C (Abb. 39 B) kein Wachstum auf. Somit konnte zudem ausgeschlossen werden, dass der Einbau der Fusionskonstrukte Temperatursensitivität zur Folge hat, andernfalls hätten die Stämme bei 25°C zumindest teilweise wachsen müssen. Nachfolgend wurde auch der Glykosylierungsstatus der CPY überprüft (Abb. 40).

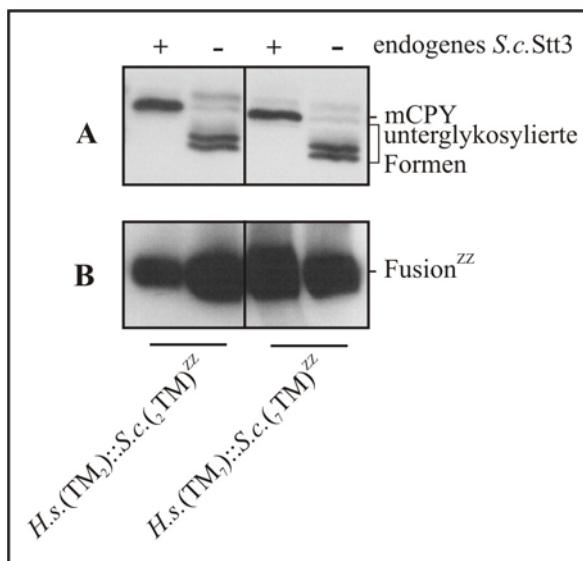


Abb. 40: Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY sowie der Expression der Fusionen in YG157. "+" kennzeichnet die Expression, "-" die Repression des genomischen *S.c.* Stt3. Beide Konstrukte zeigen keine Transferaseaktivität, visualisiert an der Unterglykosylierung der CPY mit anti-CPY Antikörper (A). Dekoration des Western Blots der Membranfraktion mit anti-*mouse* IgG zeigt deutliche Expression der Fusionsproteine (B).

Die *in vivo* Untersuchungen der CPY bestätigen das Ergebnis des Wachstumstest (Abb. 39): Beide Fusionen können die Funktion von *S.c.* Stt3 im OST-Komplex nicht ersetzen, weshalb die CPY in abgeschaltetem Zustand starke Unterglykosylierung zeigt. Anders als bei Expression von *S.c.* Stt3, wo die mature Form des vakuolären Glykoproteins zu finden ist, ist bei Repression nur die stark unterglykosyierte Form zu beobachten (Abb. 40 A), auch wenn die Fusionskonstrukte gut exprimiert werden (Abb. 40 B).

Nachdem für das *L.m.2191* beobachtet wurde, dass die C-terminal markierte Version im Gegensatz zur N-terminalen inaktiv ist (2.3), wurden die obigen Fusionskonstrukte auch mit einem N-terminalen *Flag*-Epitop exprimiert. Doch auch hier zeigten beide Chimäre keine Komplementation bezüglich Wachstum als auch Glykosylierung (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich bisher sagen, dass die Fusionsproteine *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)* und *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)* sowohl N- als auch C-terminal markiert nicht funktionell sind.

2.7.3 Untersuchung der Fusionschimäre *H.s.Stt3-A::S.c.Stt3* auf Integration in den OST-Komplex

Nachdem in Stt3-depletierten Zellen mit beiden Fusionen *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* und *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* keine Komplementation zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob es möglicherweise daran lag, dass die Fusionen nicht in den Komplex eingebaut werden. Die Signale der Fusionen in Abb. 40 B deuten an, dass genügend stabiles Protein in der ER-Membran vorhanden ist. Ob diese nun als Monomer vorliegen oder in den Komplex inkorporiert werden, sollte anhand von *Blue Native* Analysen geklärt werden.

Hierzu wurden Membranen der Fusionen *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* und *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* im Stamm YG157 nach Repression des endogenen Stt3 isoliert. Nach Solubilisierung mit dem Detergens Digitonin wurden Aliquots der Überstände auf ein natives 4-16 % Bis-Tris Gel aufgetragen und die *Blue Native* unter Standardbedingungen durchgeführt (5.3.5).

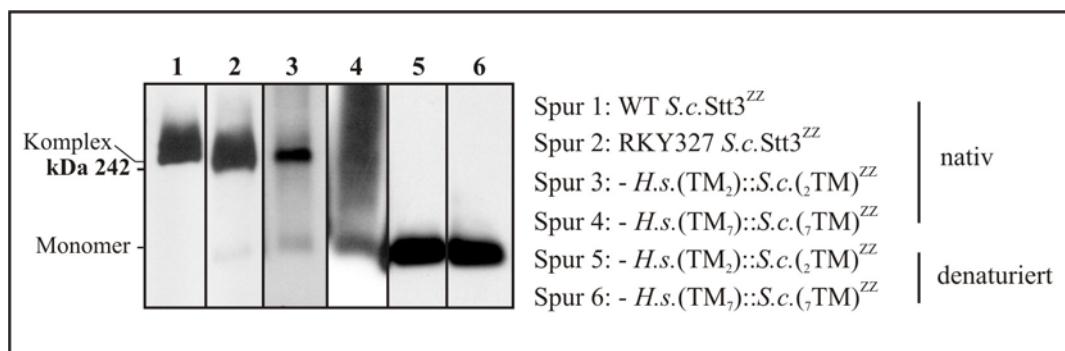


Abb. 41: Blue Native Analyse der OST-Komplexe bzw. Fusionen im Stamm YG157. Proben der Fusionen *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* und *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* aus YG157 im reprimierten Status des endogenen Stt3 ("") wurden sowohl nativ (Spur 3, 4), als auch vor Probenauftrag mit 1 % SDS denaturiert (Spur 5, 6) aufgetragen. Als Kontrolle wurde ein Wildtyp SS328 (Spur 1) und RKY327 (*Δost3/Δost6*; Spur 2) je mit Stt3^{ZZ} nativ appliziert.

Der Wildtypstamm SS328 Stt3^{ZZ} mit intakter Oligosaccharyltransferase, zeigt eine Bande bei ca. 250 kDa (Abb. 41, Spur 1), was dem charakteristischen Laufverhalten des Komplexes entspricht (Knauer *et al.*, 1999). Bei Vergleich mit dem Stamm RKY327, welchem sowohl Ost3 als auch Ost6 fehlen, sieht man einen *Shift* des Signals, hin zu einem leichten Komplex mit schnellerem Laufverhalten (Abb. 41, Spur 2). Im Falle von *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* ist das Fusionsprotein zum größten Teil auf Höhe des intakten WT-Komplexes zu finden (Spur 3). Dies bedeutet, dass die Fusion in den Komplex inkorporiert wird. Daneben ist jedoch auch eine schwache Bande auf Höhe des monomeren *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* zu sehen (vgl. Spur 3 und 5). Entweder ist der Komplex durch den Einbau der Fusion nicht so stabil wie mit *S.c.Stt3^{ZZ}*, was dafür sprechen würde, dass bis zur 2. Membranspanne Determinanten enthalten sind, welche die Stabilität des Komplexes gewährleisten. Oder aber ist durch die Überex-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

pression so viel Protein vorhanden, dass ein Bruchteil in der monomeren Form vorliegt. Die Analyse von *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* hingegen zeigt, dass dieses Hybrid überhaupt nicht in den Komplex eingebaut wird; es liegt nur in monomerer Form vor (vgl. Spur 4 und 6). Somit bleibt zu folgern, dass die N-terminale Domäne von Stt3, ob in den Transmembranspannen oder in den cytoplasmatischen bzw. ER-lokalisierten *Loops* Determinanten enthält, welche für den Einbau in den Komplex verantwortlich sind. Anhand der beiden Fusionen können die hierfür verantwortlichen Aminosäuren oder Proteinbereiche auf zwischen der 2. und 7. Transmembranspanne liegend determiniert werden, da die Fusion *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* eingebaut wird, *H.s.(TM₇)::S.c.(₇TM)^{ZZ}* hingegen nicht.

Weshalb das Hybrid *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* aber nicht aktiv ist, bleibt nur zu spekulieren. Es könnte sein, dass die Interaktion mit anderen Untereinheiten gestört ist. Da im abgeschalteten Zustand des endogenen *S.c.*Stt3 die Fusion *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* jedoch auf Höhe des Wildtyp-Komplexes zu finden ist (Abb. 41, Spur 3), deutet es darauf hin, dass der Komplex alle Untereinheiten einer funktionellen OST enthält. Daher scheint sich der Einbau des Chimaërs nicht negativ auf die Stabilität des Komplexes auszuwirken.

Bis heute ist nicht bekannt, welche Funktionen die einzelnen OST-Komponenten haben. Neben der direkten Übertragung des Oligosaccharids auf Proteine, muss die naszierende Polypeptidketten nach dem Akzeptorsequon Asn-X-Ser/Thr durchsucht und dieses dem aktiven Zentrum präsentiert werden. Ebenso muss die konservierte Oligosaccharidstruktur an ihrem Lipidanker Dolichol in der Nähe des aktiven Zentrums fixiert werden. Für letzteres könnte man sich vorstellen, dass eine Interaktion von Transmembranspannen mit dem membrangebundenen Dolichol stattfindet, wodurch das Oligosaccharid positioniert werden kann. Sollte dies eine Aufgabe von Stt3 sein, könnte es in der Fusion *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)* durch die artfremde erste Transmembranspanne gestört sein und somit den Funktionsverlust des Proteins bewirken. Denkbar wäre auch, dass der C-Terminus von Stt3 mit der ersten luminalen Domäne interagiert, in welcher hoch konservierte Aminosäuren zu finden sind (Abb. 37), um eine katalytisch, aktive Tertiärstruktur zu bilden. Dies wäre auch mit Befunden aus 2.6 kompatibel, in welchen deutlich wurde, dass eine Fusion aus Membrandomänen mit dem C-Terminus einer anderen Species kein katalytisch aktives Protein bilden kann.

Interessanterweise wird das Fusionskonstrukt *L.m.2191(TM)::S.c.(C_{ter})^{ZZ}* in den Komplex eingebaut (Abb. 27). Im Vergleich zu dem Vollängenprotein *L.m.2191*, welches nur zu einem sehr geringen Prozentsatz in den Komplex inkorporiert vorliegt, findet man die Fusion nur auf Höhe der vollständigen Oligosaccharyltransferase bei ca. 250 kDa (Abb. 27). Scheinbar vermittelt der Austausch des C-Terminus des protozoischen Stt3 mit dem von *S. cerevisiae* eine

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Proteinstruktur, welche besser in den Komplex passt. Trotz der geringen Sequenzhomologie in den Transmembranspannen (Abb. 22) scheinen diese eine Topologie ähnlich des *S.c.*Stt3 einzunehmen, wodurch sie in den Komplex passen. Nachdem die Untersuchungen an *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ} und *H.s.*(TM₇)::*S.c.*(₇TM)^{ZZ} zeigten, dass Determinanten zwischen der 2. und 7. Transmembranpanne für Integration in die OST nötig sind, scheinen diese auch in den Membrandomänen von *L.m.*2191 vorhanden zu sein.

2.7.4 Mutationsanalysen des ersten luminalen *Loops* von *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ}

Wie in 2.7.2 und 2.7.3 gezeigt werden konnte, wird die Fusion *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ} zwar in den OST-Komplex inkorporiert, ist dort jedoch nicht katalytisch aktiv. Wie für den C-Terminus von *S.c.*Stt3^{ZZ} belegt werden konnte, bedingen Austausche einzelner hoch konservierter Aminosäuren bereits einen Funktionsausfall (2.1.5). Auch wenn es sich hier um Aspartatreste handelt, welchen eine Rolle in der Katalyse zugesprochen wird, ist es unwahrscheinlich, dass alle dieser über den C-Terminus verteilten Aminosäuren im katalytischen Zentrum sitzen. Um der Frage nachzugehen, ob konservierte Aminosäuren im 1. luminalen *Loop* für eine mögliche Interaktion mit dem C-Terminus, anderen Untereinheiten oder Komponenten zur Bildung eines katalytisch aktiven Fusionsproteins von Bedeutung sind, wurden im Konstrukt *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM)^{ZZ} gezielt Mutationen eingeführt. Anhand eines Sequenzvergleichs des ersten im ER-lokalisierten *Loops* von Hefe, Mensch und Maus (Abb. 42) wurden einzelne Aminosäuren festgelegt, die wie in Tab. 15 angegeben, durch Mutation an die Sequenz von Hefe angeglichen wurden.

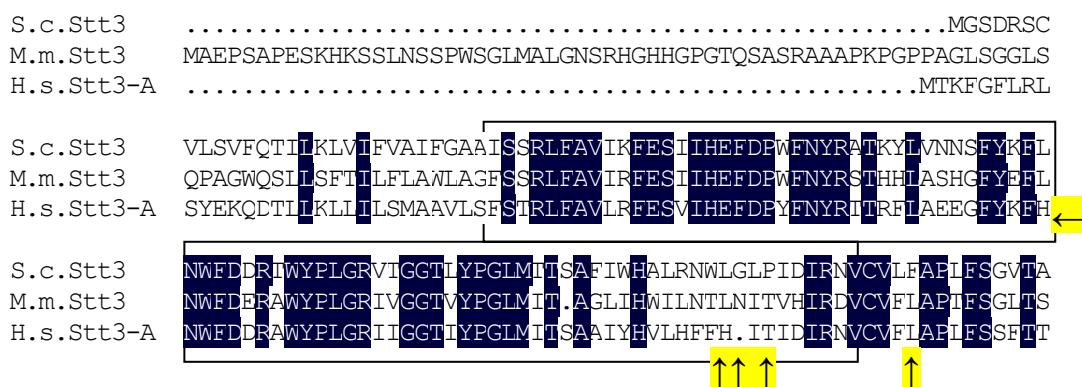


Abb. 42: Sequenzalignment des N-Terminus von Stt3 aus Mensch, Hefe und Maus. Die erste luminal Domäne ist schwarz eingerahmt, identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Mit Hilfe des Site-directed mutagenesis Kit (Stratagene) mutierte Aminosäuren sind mit gelb unterlegtem Pfeil angegeben.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Mutation	Anmerkung
H69L	Angleichung an konserviertes L aus Hefe und Maus
H107L	Angleichung an konserviertes L aus Hefe und Maus
+G108	Einfügen der aa G, Situation analog Hefe
T109P	Angleichung an P von Hefe → mögliche Strukturänderung
E119F	bei Fusion entstandene Sequenz LE (<i>Xhol</i> -Schnittstelle) zurück zu LF von Hefe (Abb. 35)

Tab. 15: Gewählte Punktmutation für den 1. luminalen Loop von *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}*.

Die in Abb. 42 und Tab. 15 angegebenen Aminosäuren wurden mit Hilfe des *Site-directed mutagenesis Kit* (Stratagene) in die Fusion *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* eingeführt und nachfolgend bei Repression des endogenen Stt3 im Stamm YG157 analysiert.

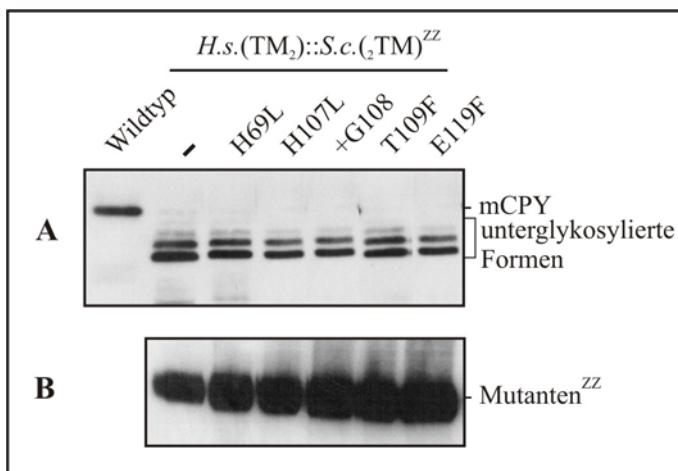


Abb. 43: *In vivo* Analyse der Mutanten von *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* im Stamm YG157. Die Extrakte wurden bei Repression des endogenen Stt3 bei 25°C isoliert. Die Dekoration des *Western Blots* erfolgte mit anti-CPY (A) bzw. anti-Flag Antikörper.

Wie aus Abb. 43 B ersichtlich, werden auch die mutierten Fusionen stark exprimiert. Doch zeigt eine Analyse der CPY im *S.c.*Stt3-depletierten Zustand auch hier nur die unterglykosylierte Form; es ist keine Komplementation zu erkennen (Abb. 43 A). Somit kann weder die Mutagenese der Histidine zum Leucin (H69L, H107L), noch das Einfügen der Aminosäure G (+G108) ein funktionelles Protein generieren. Auch der Austausch des Threonins nach einem Prolin (T109P), womit möglicherweise eine Strukturänderung einhergeht, zeigt keinen positiven Effekt auf die Aktivität des OST-Komplexes. Da sich das Prolin nur fünf Aminosäuren vor Beginn der 2. Transmembranspanne befindet (Abb. 42), könnte sein, dass es dort eine wichtige Rolle bei der Konformation von *Loop 1* spielt. Die Mutante, in welcher die durch die Fusion entstandenen Aminosäuren LE zurück zur Ursprungssequenz LF aus Hefe getauscht wurden (E119F), ist ebenso nicht zur Katalyse fähig. Auch wenn sich dieses kurze Motiv in der Membran befindet, könnte das durch die Schnittstelle eingebrachte negativ geladene Glutamat mit seiner sauren Eigenschaft anstelle des aromatischen Phenylalanins mögliche Interaktionen negativ beeinflussen. Es lässt sich die Bilanz ziehen, dass mittels der hier eingeführ-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

ten Mutagenesen keine Determinanten identifiziert werden konnten, wodurch die Fusion *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* zu einem funktionellen Homolog des *S.c.Stt3* wird. Mehr Aufschluss könnten weitere gezielte Mutationen im ersten luminalen *Loop* sowie eine Zufallsmutagenese über das ganze Fusionskonstrukt geben. Überdies würde der umgekehrte Weg bei ortsgerichteter Mutagenese in der ersten ER-lokalisierten Domäne des aktiven *S.c.Stt3^{ZZ}* Informationen geben, welche Aminosäuren in diesem Bereich essentiell sind, und bei Ausfall ein nicht wieder aktives Protein generieren. Diese identifizierten Reste könnten, transferiert auf das Fusionskonstrukt, eventuell dessen Funktionalität wieder herstellen. Anhand des Konstrukts *H.s.(TM₂)::S.c.(₂TM)^{ZZ}* können somit wichtige Daten bezüglich der Funktionalität von Stt3 gesammelt werden.

2.8 Versuche zur Generierung einer enzymatisch aktiven Oligosaccharyltransferase aus *S. cerevisiae*

Der bisherige Teil der Arbeit beschäftigte sich vor allem damit, Stt3 aus unterschiedlichen Organismen in der Bäckerhefe zu analysieren, um mehr über seine Funktion und den Einbau in den OST-Komplex zu erfahren. Im folgenden Abschnitt nun sollte durch Expression von *S.c.Stt3* in *E.coli* und in einem zellfreien *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem (TNT) versucht werden, die postulierte Rolle als katalytische aktive Untereinheit der OST zu beweisen. Obgleich verschiedene experimentelle Befunde dafür sprechen, konnte eine direkte enzymatische Aktivität von *S.c.Stt3* allein noch nicht gezeigt werden. Da sich schnell herauskristallisierte, dass Stt3 keine enzymatische Aktivität zeigt, wurden zusätzlich die beiden anderen essentiellen Untereinheiten *S.c.Wbp1* und *S.c.Ost1* exprimiert. Sie ragen ebenso wie Stt3 weit in das Lumen des ER (Abb. 2), und könnten aufgrund dieser Topologie zusammen mit Stt3 an der Ausbildung eines katalytisch aktiven Minimalkomplexes beteiligt sein, welcher in PE-Vesikeln rekonstituiert werden sollte.

2.8.1 Ein in PE-Vesikeln rekonstituierter OST-Komplex aus Hefe besitzt katalytische Aktivität

Da es sich bei allen Untereinheiten des OST-Komplexes um Membranproteine handelt, wurde versucht, ein System zu etablieren, mit dem Stt3, Ost1 und Wbp1 in Lipidvesikel integriert werden. In Vorversuchen sollte der OST-Komplex aus *S. cerevisiae* solubilisiert und in Vesikeln rekonstituiert werden. Transferasetests sollten zeigen, ob der in Mikrosomen integrierte Komplex seine Aktivität beibehält und genügend stabilisiert wird, d.h. eine Rekonstitution

ERGEBNISSE und DISKUSSION

überhaupt möglich ist. In Anlehnung an die Rekonstitution des HUP1-Transporters aus *Chlorella kessleri* (Caspari *et al.*, 1996; Opekarová *et al.*, 1999) wurde als Detergens Oktylglukosid (OG) zur Solubilisierung verwendet, welches durch Dialyse in Gegenwart von Phosphatidylethanolamin (PE) gegen das Phospholipid ausgetausch wurde .

Zunächst wurden Membranen des Wildtyp-Hefestamms SS328 verwendet, in welchem Stt3 Protein A-markiert ist (*S.c.Stt3^{ZZ}*). Die Analyse der rekonstituierten Vesikel erfolgte über *Western Blot*. Zur Solubilisierung wurde 1 % OG sowie 0.5 M KCl verwendet. Da für die Solubilisierung der heterolog in *E. coli* exprimierten OST-Proteine neben 1 % OG auch 0.3 % SDS benötigt wurde (siehe 2.7.3), wurden selbige Konditionen ebenfalls getestet. Das erhaltene Solubilisat wurde nun mit PE aus *E. coli* über Nacht bei 4°C dialysiert und nach Aufarbeitung in einen *in vitro* OST-Aktivitätstest eingesetzt sowie über *Western Blot* analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt.

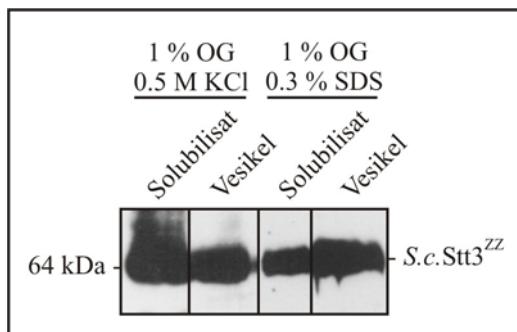


Abb. 44: Western Blot Analyse unterschiedlich solubilisierter und rekonstituierter OST-Komplexe aus SS328 *S.c.Stt3^{ZZ}*. Die Membranen wurden wie in 5.3.9 beschrieben mit 1 % OG (w/v) und 0.5 M KCl bzw. 0.3 % SDS (w/v) solubilisiert. 100 µg des Überstandes wurden mit 2 mg PE in einem Dialysierschlauch ÜN dialysiert und fertig aufbereitet (5.3.9). Aliquots des Überstandes nach Solubilisierung sowie der resuspendierten Vesikel wurden über *Western Blot* analysiert, der Komplex über *S.c.Stt3^{ZZ}* mit anti-*mouse* IgG detektiert.

Wie aus Abb. 44 ersichtlich, ist das nach Solubilisierung im Überstand befindliche *S.c.Stt3^{ZZ}* durch Dialyse in die PE-Vesikel integriert worden. Auch der Zusatz von SDS scheint den Einbau in die Mikrosomen nicht zu stören. Ferner sollte ein OST-Aktivitätstest Aufschluss geben, ob die eingelagerte OST katalytische Aktivität besitzt. Hierzu wurden Aliquots der Vesikelpräparation sowie des verwendeten Solubilisats aus Abb. 44 in den *in vitro* Test eingesetzt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

	Aktivität mit YNSTSV und DolPP-GlcNAc ₂	
Solubilisat 1 % OG & 0.5 M KCl	100 %	
Solubilisat 1 % OG & 0.3 % SDS	95 %	ÜN bei 4°C gelagert
Vesikel 1 % OG & 0.5 M KCl	140 %	
Vesikel 1 % OG & 0.3 % SDS	131 %	ÜN bei 4°C dialysiert

Tab. 16: *In vitro* OST-Aktivitätstest mit Solubilisat der OST-Rekonstitution aus Abb. 44. Je 100 µg Protein wurden in den OST-Aktivitätstest mit Hexapeptid YNSTSV und Donorsubstrat DolPP-GlcNAc₂ eingesetzt und für 10 min bei 24°C inkubiert. Die Werte des Solubilisats (1 % OG & 0.5 M KCl) wurden gleich 100 % gesetzt, die anderen Werte darauf bezogen.

Wie aus Tab. 16 ersichtlich, zeigt das Solubilisat mit 0.3 % SDS nur 5 % weniger Aktivität als das mit 0.5 M KCl behandelte. Somit scheint sich SDS in der verwendeten Konzentration nicht negativ auf die Aktivität auszuwirken. Der Vergleich mit den in Vesikeln rekonstituierten OST-Komplexen zeigt deutlich, dass durch Integration in PE-Mikrosomen eine Stabilisierung auftritt und die Aktivität von 100 auf 140 % steigt. Die Transferrate der Vesikel der mit 1 % OG und 0.3 % SDS solubilisierten OSTs zeigt ebenfalls eine Steigerung von 95 % auf 131 %. Somit war ein System etabliert, in welchem die OST katalytisch aktiv ist.

2.8.2 Heterolog in *E. coli* exprimierte S.c.Stt3 besitzt auch in Kombination mit S.c.Wbp1 und S.c.Ost1 keine Transferaseaktivität

Der Grundgedanke zunächst war, durch heterologe Expression in *E. coli* ein katalytisch aktives S.c.Stt3 zu exprimieren. In Anlehnung an die Rekonstitutionsexperimente von C.j.PglB in *E. coli* (Wacker *et al.*, 2002), in denen PglB allein enzymatische Aktivität zeigte, sollte Stt3 aus Hefe in die Cytoplasmamembran von *E. coli* integriert werden und zwar so, dass die C-terminale, lösliche Domäne in den periplasmatischen Raum ragt, welcher funktionell dem ER-Lumen entspricht. In dieser Konformation sollte das katalytische Zentrum nach Aufschluß der Zellen von außen zugänglich sein und in den OST-Aktivitätstest eingesetzt werden. Da die Tests ergaben, dass Stt3 allein inaktiv ist, sollten die beiden Untereinheiten Ost1 und Wbp1 co-exprimiert werden. Zusammen mit Stt3 in PE-Vesikeln rekonstituiert, sollte der Minimalkomplex auf OST-Aktivität getestet werden. Die Gene wurden ohne Signalsequenz in den Vektor pASK-IBA2 kloniert, wodurch N-terminal eine ompA-Signalsequenz und C-terminal ein Strep-Tag fusioniert wurde. OmpA ist eine *E. coli* eigene Signalsequenz, die Proteine in den periplasmatischen Raum dirigiert. Aufgrund der Membranspannen, sollten die drei Untereinheiten in der Cytoplasmamembran analog der ER-Membran in Hefe integriert werden.

Nach Präparation von *E. coli* Membranen wurden die Proteine solubilisiert und in PE-Vesikel rekonstituiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 dargestellt.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

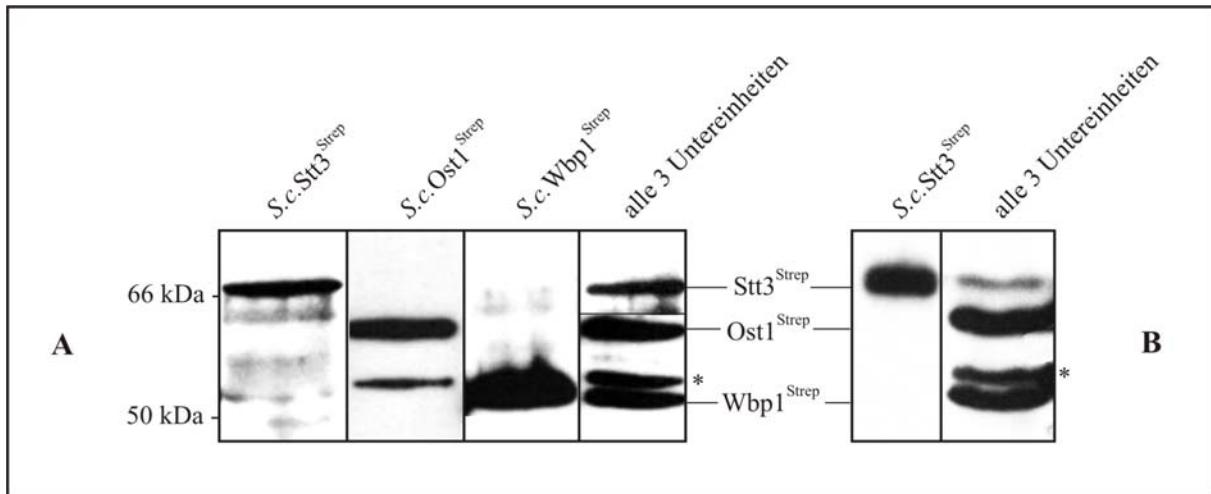


Abb. 45: Western Blot Analyse von *S.c.Stt3^{Strep}*, *S.c.Ost1^{Strep}* und *S.c.Wbp1^{Strep}* Solubilisat und rekonstituiert in PE-Vesikel. Eine ÜN-Kultur wurde 1:50 verdünnt, bei 30°C bis OD₆₀₀ ~0.5 weiterinkubiert. Die Induktion erfolgte mit 0.2 mg/l Anhydrotetracyclin für 3h bei 30°C (Ost1, Wbp1) bzw. für 24 h bei 16°C (Stt3). Nach Isolierung der Rohmembranen wurden die *Strep*-markierten Proteine mit 1 % OG (w/v) & 0.3 % SDS (w/v) solubilisiert (A). Entweder nur *S.c.Stt3^{Strep}* oder alle drei Untereinheiten zusammen wurden erfolgreich in PE-Vesikel rekonstituiert (B). Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mit anti-*Strep* Antikörper dekoriert. Bei der mit * bezeichneten Bande handelt es sich um ein Artefakt der Expression von *S.c.Ost1^{Strep}*. Zur Detektion des Signales von *S.c.Stt3^{Strep}* musste der Röntgenfilm länger exponiert werden.

Die Proteine ließen sich, wie in den Vorversuchen erarbeitet, mit 1 % OG & 0.3 % SDS solubilisieren. Auch ein Ansatz, in welchem die vereinigten Rohmembranen aller drei Konstrukte gemeinsam solubilisiert wurden, zeigte Erfolg (Abb. 45 A). Hierbei war die Möglichkeit gegeben, bereits bei Solubilisierung einen möglichen Minimalkomplexes zu bilden. Die anschließende Rekonstitution in PE-Vesikel verlief ebenso positiv. Sowohl das einzelne Protein *S.c.Stt3^{Strep}* als auch die Kombination mit den anderen beiden essentiellen Untereinheiten konnte im *Western Blot* in den PE-Vesikeln nachgewiesen werden. Ein nachfolgender OST-Aktivitätstest mit dem Hexapeptid YNSTSV und DolPP-GlcNAc₂ als Glykosyldonor zeigte jedoch, dass keines der Einzel-Solubilisate und auch nach Integration der Proteine in PE-Vesikel Transferaseaktivität besitzt. Ein Problem, das sich hierbei stellte, war, dass *E. coli* eine große Anzahl an Pyrophosphatasen besitzt, welche im OST-Test unspezifisch das Oligosaccharid vom Dolicholanker spalten. Durch Zugabe von 5 mM NaPP konnten die Pyrophosphatasen gehemmt werden, jedoch musste durch Gabe von 20 mM MnCl₂ die Menge des Cofaktors Mn²⁺ erhöht werden, da NaPP diesen komplexiert und in Tests mit Hefemembranen den Transfer drastisch senkte (Daten nicht gezeigt). Diese Kombination zeigte mit Membranen von *E. coli* ca. 50 % Leerübertragung. Vor diesem Hintergrund sollte es dennoch möglich sein, eine Aussage über eine rekonstituierte OST-Aktivität von Stt3 zu machen. Wie bereits oben erwähnt, zeigte jedoch weder *S.c.Stt3^{Strep}* noch ein Minimalkomplex mit *S.c.Ost1^{Strep}* und *S.c.Wbp1^{Strep}* Aktivität, ob als Solubilisat oder in Vesikel rekonstituiert. Bleibt zu speku-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

lieren, weshalb die Proteine keine Oligosaccharide übertragen. Möglicherweise ist der Glykosylierungsstatus von *S.c.*Stt3 entscheidend, da, wie bereits in 2.2.5 erwähnt, die Modifikation essentiell ist. Auch *S.c.*Ost1 und *S.c.*Wbp1 sind Glykoproteine. Selbst wenn die Glykosylie rung als solche keinen Einfluss auf die Aktivität der Proteine hat (Li *et al.*, 2005), könnte die Modifikation für die Assemblierung des Komplexes förderlich sein. Es drängt sich auch die Vermutung auf, dass aufgrund der oligomeren Komplexbildung in Hefe und Höheren Eukaryoten einzelne Untereinheiten ihre Funktion nicht alleine ausführen können, sondern nur im Verbund des Komplexes. Eventuell ist aber auch eine optimale Faltung der Proteine bei Expression in *E. coli* nicht gewährleistet. Auch die Integration in die periplasmatische Membran könnte abweichend von der in die ER-Membran geschehen.

2.8.3 Rekonstitution von zellfrei translatiertem *S.c.*Stt3, *S.c.*Ost1 und *S.c.*Wbp1

Da die heterologe Expression von OST-Untereinheiten in *E. coli* das Problem unspezifisch spaltender Pyrophosphatasen aufwarf (2.8.2), wurde auch das *in vitro* Transkriptions- und Translations-System eines Reticulocyten Lysats (Promega) genutzt, um die drei essentiellen Untereinheiten Stt3, Wbp1 und Ost1 zu synthetisieren. Hierzu wurden die Gene in den Vektor pTNTTM (Promega) kloniert, welcher einen SP6 und T7 Promotor enthält. Durch Zugabe der zugehörigen Polymerasen wurden die Proteine exprimiert und konnten über Einbau von ³⁵S-Methionin autoradiographisch verfolgt werden. Die Ergebnisse der Expression sind in Abb. 46 dargestellt.

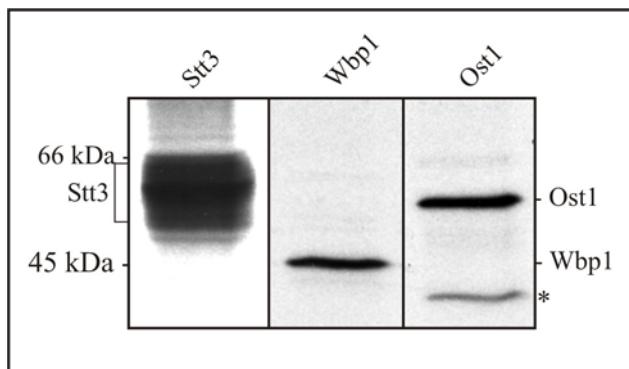


Abb. 46: Expression von *S.c.*Stt3, *S.c.*Wbp1 und *S.c.*Ost1 im TNT-System mit ³⁵S-Methionin. Mittels T7-Polymerase für Stt3 und Ost1 bzw. SP6-Polymerase für Wbp1 wurden die Gene im Vektor pTNT transkribiert und durch Zusatz von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert translatiert. Die Analyse erfolgte auf einer 8 % SDS-PAGE, die Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. * indiziert eine Artefaktbande der Expression von Ost1.

Da die Proteine ohne Signalsequenz transkribiert und translatiert wurden, und im Reticulocyten Lysat keine N-Glykosylierung stattfindet, entsprechen die Signale in Abb. 46 der moleku-

ERGEBNISSE und DISKUSSION

laren Masse der nackten Polypeptide. Ost1 und Wbp1 laufen ca. bei dem errechneten Molekulargewicht von 60 bzw. 45 kDa. Die Expression von Stt3 zeigt wie berichtet (1.1) ein anomales Laufverhalten mit einer diffusen Bande mit Schwerpunkt bei ca. 62 kDa, entgegen dem errechneten Molekulargewicht von 78 kDa. Um bereits bei Expression eine lipidähnliche Umgebung zu schaffen, wurde die Expression in Gegenwart von 0.1 % OG durchgeführt, das Ergebnis glich dem in Abb. 46 (Daten nicht gezeigt). Zunächst wurden die einzelnen Proteine Stt3, Wbp1 und Ost1 in den OST-Aktivitätstest mit YNSTSV als Peptid und DolPP-GlcNAc₂ als Glykosyldonor eingesetzt. Es konnte jedoch keine Aktivität detektiert werden. Auch ein Ansatz mit allen drei Proteinen blieb erfolglos. Zuletzt wurde versucht, durch Rekonstitution von Stt3, Wbp1 und Ost1 in PE-Vesikeln einen Minimalkomplex aus allen drei Proteinen zu bilden. Abgesehen von den nicht essentiellen Untereinheiten Ost3/Ost6, Ost4 und Ost5 sollte, sofern Stt3 alleine nicht genügt, ein Komplex aus den essentiellen Polypeptiden ausreichen, um N-Glykosylierung durchzuführen. Die Proteine wurden in Gegenwart von 0.1 % OG exprimiert und nachfolgend zusammen mit PE über Nacht dialysiert. Die Vesikel wurden nun in den OST-Test analog oben eingesetzt, zeigten jedoch auch in dieser Form keine Aktivität. Ein parallel in PE-Vesikeln rekonstituiertes Stt3 (ohne Ost1 und Wbp1) konnte ebenfalls keinen Transfer durchführen.

Abschließend bleibt festzustellen, dass auch in diesem System kein katalytisch aktives Stt3 und auch kein katalytisch aktiver Minimalkomplex generiert werden konnte. Möglicherweise werden in Höheren Eukaryoten im Gegensatz zu *C. jejuni* und *L. major* tatsächlich noch weitere Untereinheiten, vielleicht sogar auch die nicht essentiellen benötigt, um einen aktiven OST-Komplex zu bilden. Auch wenn Ost3 und Ost6 keine essentiellen Untereinheiten darstellen, ist in der Doppeldisruptante in diesen beiden Genen eine starke Unterglykosylierung zu beobachten, was dafür spricht, dass die Genprodukte zumindest für effektive Glykosylierung gebraucht werden (Knauer und Lehle, 1999b).

3. Zusammenfassung

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Protein N-Glykosylierung eine bedeutende Rolle im Lebenszyklus und Stoffwechsel aller Eukaryoten spielt. Allein die Tatsache, dass ca. 90 % aller sekretorischen Proteine mit Zuckern modifiziert sind, lässt erahnen, welch tragende Funktion diese Strukturen den Polypeptiden verleihen. Die stetig steigende Zahl an Krankheitsbildern, zusammengefasst unter dem Syndrom *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG), zeigt in immer größerem Ausmaß, dass Defekte in der N-Glykosylierung beim Menschen gravierend in die Entwicklung eingreifen und dabei schwere klinische Symptome erzeugen (Jaeken *et al.* Carchon, 2001; zusammengefasst in Lehle *et al.*, 2006). Nicht zuletzt aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren enorme Anstrengungen unternommen, die Grundlagen dieser essentiellen Modifikation zu verstehen. Dies trifft vor allem auf den finalen Schritt zu, den Transfer von GlcNAc₂Man₉Glc₃ von seinem Lipidanker Dol-PP auf das Asparagin im Sequon Asn-X-Ser/Thr naszierender Polypeptidketten durch die *Oligosaccharyltransferase* (OST). Im Zuge der fortschreitenden Genomsequenzierungen konnte zwar die Zusammensetzung des ER-residenten, membranständigen OST-Komplexes aus unterschiedlichen Organismen geklärt werden, die Rolle oder Funktion der essentiellen, auch die der nicht essentiellen Untereinheiten ist jedoch weitgehend unbekannt.

Im Fokus dieser Arbeit stand Stt3, eine essentielle Untereinheit der OST. Die hohe Konserverung des offenen Leserahmens aus *S. cerevisiae* im Vergleich zu Höheren Eukaryoten legte zu Beginn der Arbeit die Vermutung nahe, dass es sich bei Stt3 um die katalytische Untereinheit handeln könnte (1.2). Mit Hilfe des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* sollte dieser Frage nachgegangen werden.

3.1 Die C-terminale, luminale Domäne von *S.c.*Stt3 enthält essentielle Aspartatreste in konservierten DXD-Motiven

Der Sequenzvergleich des offenen Leserahmens von *STT3* aus Bäckerhefe mit dem Höheren Eukaryoten erlaubte die Identifizierung konservierter Aspartate (Abb. 7). Die Anordnung in einem sog. DXD/DDX-Motiv gab Anlass zur Vermutung, dass es sich hier um Aminosäurereste handelt, die direkt an der Katalyse der OST-Reaktion beteiligt sind. Aus Vergleich zahlreicher pro- und eukaryotischer Glykosyltransferasen war bekannt, dass diese Enzyme DXD-Motive im katalytischen Zentrum tragen. Die Röntgenstrukturanalyse der N-Acetylglukosaminyltransferase I aus Hase belegte letztendlich, dass die sauren Aspartatreste den Cofaktor

ZUSAMMENFASSUNG

Mangan komplexieren, an welchen wiederum die Sauerstoffatome des Pyrophosphat aktivierte Zuckerreste gebunden sind und hierüber die Reaktion ablaufen kann (1.2). Da sich ein ähnlicher Mechanismus für die OST vermuten lässt, standen die Aspartatreste der DXD-Motive in der C-terminalen, luminalen Domäne von *S.c.*Stt3 im Fokus der Untersuchungen. Anhand gezielter Austausche dieser sauren Aminosäurereste sollte der Einfluß auf die Funktionalität von Stt3 gezeigt werden (Tab. 2). Im temperatursensitiven Hefestamm *stt3-7*, welcher aufgrund einer Punktmutation im genomisch codierten Stt3 Unterglykosylierung zeigt, sollten die durch Überexpression der mutierten *STT3*-Allele erzeugten Phänotypen analysiert werden. *In vivo* Markierungen der CPY belegten, dass die Mutation beider Aspartatreste im Motiv $_{508}\text{DED}_{510}$ den Unterglykosylierungsphänotyp von *stt3-7* komplementieren. Somit scheinen diese Aminosäuren für die Aktivität des OST-Komplexes nicht essentiell zu sein. Ebenso verhielt es sich für D495 im Motiv $_{494}\text{DDF}_{496}$ und D565 im Motiv $_{565}\text{DVD}_{567}$ (Tab. 4). Auch wenn in diesen beiden DXD/DDX-Clustern die jeweils anderen Aspartate D494 (Abb. 11) bzw. D567 essentiell sind, kann nahezu ausgeschlossen werden, dass sie an der Koordination von Manganionen beteiligt sind, da zur Katalyse beide Aspartatreste des Motivs benötigt werden. Das auch im Stt3-Homolog PglB des Eubakteriums *C. jejuni* konservierte Motiv $_{516}\text{WWDYG}_{520}$ enthält ein essentielles Aspartat, wie durch eine Tetradenanalyse belegt werden konnte (Tab. 4). Möglicherweise ist dieses Motiv an der Erkennung der Akzeptorsequenz Asn-X-Ser/Thr beteiligt. Die weitere Mutation D534 im Motiv $_{534}\text{DNNT}_{537}$ erwies sich ebenfalls als essentiell (Tab. 4). Hier lässt sich jedoch vermuten, dass die Glykosylierung von Stt3 selbst betroffen ist. Der Ausfall dieser für das Protein essentiellen Modifikation könnte aufgrund einer dadurch bedingten Konformationsänderung zur Inaktivität des Polypeptids führen. Einzig das Motiv $_{582}\text{DDI}_{584}$ kommt als „heißen“ Kandidat der Koordination der Manganionen in Frage. *In vivo* und *in vitro* Analysen belegten, dass beide Aspartate für die Aktivität des OST-Komplexes unabdingbar sind (Abb. 9; Tab. 3) und können als ein Indiz gewertet werden, dass es sich bei Stt3 um die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes handelt.

3.2 Analyse der Stt3-Homologen aus *C. jejuni* und *H. sapiens*

Neben *S.c.*Stt3, wurden auch die homologen Proteine aus *Campylobacter jejuni* und *Homo sapiens* untersucht.

Die Entdeckung der Pgl-Glykosylierungsmaschinerie aus *C. jejuni* belegte, dass in dem pathogenen Eubakterium N-Glykosylierung stattfindet. Die Tatsache, dass das Cluster nur das zu Stt3-homologe PglB codiert, bekräftigt die Rolle von Stt3 als katalytische Untereinheit der

ZUSAMMENFASSUNG

OST. Anhand der Überexpression von PglB in *S. cerevisiae* sollten Daten gesammelt werden, ob dieses Protein *S.c.*Stt3 im Komplex funktionell ersetzen kann. Analysen der CPY ergaben, dass *C.j.*PglB den Unterglykosylierungsphänotyp des Stammes *stt3-7* nicht revertieren kann (Abb. 14). Während der Doktorarbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass nicht das in Eukaryoten konservierte Sequon Asn-X-Ser/Thr ausreichend ist für Glykosylierung, sondern zusätzlich eine saure Aminosäure an Position -2 relativ zum Asparagin benötigt wird. Es konnte jedoch auch in Aktivitätstests mit optimierten Akzeptorpeptiden einschließlich des erweiterten Sequons Glu/Asp-X-Asn-X-Ser/Thr keine *in vitro* Aktivität von PglB gemessen werden (Tab. 7). Gezielte Aminosäureaustausche ergaben, dass PglB an zwei von drei Glykosylierungsstellen in der C-terminalen Domäne modifiziert ist (Abb. 17), wobei Untersuchungen des Glykosylierungsstatus von CPY in den Mutanten zeigten, dass PglB weder im zweifach noch im unglykosylierten Zustand katalytisch aktiv ist. Nachdem auch die Einführung des in *S.c.*Stt3 essentiellen Glykosylierungssequons DNNTWNNT in PglB kein aktives Protein generierte (Abb. 19), kann nahezu ausgeschlossen werden, dass eine durch Glykosylierung bedingte Konformation von PglB für die Inaktivität verantwortlich ist. Vielmehr bleibt zu postulieren, dass PglB die dolicholgebundenen Oligosaccharide der Hefe nicht als Substrat akzeptiert, da die Glykane in *C. jejuni* an einen Isoprenolanker geknüpft sind.

3.3 Das Stt3-Homolog *L.m.2191* unterstützt die Rolle von Stt3 als katalytisch aktive Untereinheit

Leishmania major ist ein protozoischer Parasit und gehört zur Familie der Trypanosomatidae. Aufgrund von Genomanalysen wird postuliert, dass die OST in diesen Organismen, ähnlich *C. jejuni* aus nur einem zu Stt3 homologen Protein besteht. Die Überexpression des Stt3-Homologs *L.m.2191* zeigte, dass bei Repression von genomisch codiertem *S.c.*Stt3 eine fast vollständige Glykosylierung der CPY zu beobachten war (Abb. 24). OST-Tests bestätigten die funktionelle Rolle des protozoischen Homologs. Durch Verwendung unterschiedlich langer Oligosaccharide GlcNAc₂Man₅₋₉ sowie GlcNAc₂Man₉Glc₃ konnte gezeigt werden, dass *L.m.2191* sowohl *in vivo* als auch *in vitro* breite Substratspezifität besitzt und entgegen der OST aus Hefe und Höheren Eukaryoten auch unglukosylierte Glykane mit hoher Effizienz überträgt (2.3.4). Wie sich bereits in OST-Aktivitätstests andeutete, liegt *L.m.2191* in der ER-Membran in zwei Formen vor: Ist *S.c.*Stt3 in der Zelle vorhanden, befindet es sich außerhalb des Komplexes und überträgt unspezifisch nur unglukosylierte Oligosaccharide. Bei Repression des endogenen *S.c.*Stt3 konnte in *Blue Native* Analysen gezeigt werden, dass ein

ZUSAMMENFASSUNG

Bruchteil des exprimierten *L.m.2191* in den OST-Komplex rekrutiert wird und dort die Fähigkeit zurückerlangt, GlcNAc₂Man₉Glc₃ zu transferieren (2.3.5). Da stets freies *L.m. Stt3* in der ER-Membran residiert und dort aktiv ist, konnte nicht nachgewiesen werden, ob *L.m.2191* auch innerhalb des OST-Komplexes seine Fähigkeit zur unspezifischen Übertragung kürzerer Oligosaccharidstrukturen beibehält. Die Ergebnisse halfen jedoch zur Klärung der Beobachtung, dass Tetraden mit *L.m.2191* nach Sporulation letal sind (Abb. 25). Die Frage nach der Assoziation von freiem *L.m.2191* mit dem Translokator bleibt offen. Es wäre daher plausibel, dass freies *L.m.2191* nicht alle Glykoproteine modifiziert, wenn diese in das ER-Lumen geschleust werden. Sollte dies Polypeptide betreffen, welche bei oder nach Sporulation benötigt werden, könnte dies zu Letalität der Zellen führen.

Die Versuche bewiesen jedoch zweifelsfrei, dass *L.m.2191* in *S. cerevisiae* katalytische Aktivität besitzt. Vor allem die Aktivität als Monomer ist als deutlicher Hinweis zu sehen, dass es sich auch bei dem Stt3 aus Hefe um die katalytisch aktive Untereinheit des OST-Komplexes handelt.

3.4 Fusionskonstrukte zwischen *S.c.Stt3* und Homologen von *C. jejuni*, *H. sapiens* und *L. major* deuten innermolekulare Wechselwirkungen in Stt3 an

Durch Austausch der Transmembranspannen und der C-terminalen, luminalen Domäne von Stt3 sollte versucht werden, aus den inaktiven Homologen *C.j.PglB* und *H.s.Stt3-A* katalytisch aktive Proteine zu generieren. Unterschiede im Bereich der Transmembranspannen wurde als Hauptgrund angesehen, weshalb Stt3-Homologe nicht in den OST-Komplex aus Hefe eingebaut werden und inaktiv sind. Die Analyse sämtlicher Fusionen zwischen *S.c.Stt3* und den Homologen aus *C. jejuni* und *H. sapiens* zeigte jedoch eindeutig, dass auch ein Domänen-austausch nicht zum Erfolg führt (2.6.1; 2.6.3).

Das Homolog *L.m.2191* ist in Hefe katalytisch aktiv (2.3). Die Fusion zwischen *S.c.Stt3* und *L.m.Stt3* ergab, dass obwohl beide Vollängenproteine *per se* aktiv sind, eine Kombination nicht funktionelle Proteine generiert (Abb. 35). Zusammen mit obigen Ergebnissen besteht die Vermutung, dass erst durch Interaktion der C-terminalen, luminalen Domäne mit den N-terminalen Transmembranspannen eine Konformation generiert wird, wodurch Stt3 katalytisch aktiv ist. Durch Feinabstimmung dieser innermolekularen Wechselwirkung innerhalb jeden Stt3-Homologs scheint ein Austausch der Domänen des Proteins aus unterschiedlichen Organismen nicht möglich.

ZUSAMMENFASSUNG

3.5 Der N-Terminus von *S.c.*Stt3 enthält Determinanten zum Einbau und zur Generierung eines katalytisch aktiven Proteins

Weitere Fusionen zwischen *H.s.*Stt3-A und *S.c.*Stt3 zeigten, dass der N-Terminus von *S.c.*Stt3 kritisch für den Einbau des Proteins in den OST-Komplex ist. Aufgrund der großen Homologie zwischen *H.s.*Stt3-A und *S.c.*Stt3 wurde eine ähnliche Topologie der Polypeptide postuliert (2.7.1). Fusionen der Homologen sollten darlegen, ob *S.c.*Stt3 für seine Inkorporation und Aktivität die gesamte Vollängenstruktur benötigt. Daher wurde der N-Terminus von *S.c.*Stt3 vom Start-Methionin bis Mitte der 2. bzw. der 7. Transmembranspanne mit den homologen Bereichen von *H.s.*Stt3-A ausgetauscht. Wie *Blue Native* Analysen belegten, wird die Fusion *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM) in den OST-Komplex eingebaut, das Chimär *H.s.*(TM₇)::*S.c.*(₇TM) hingegen nicht (Abb. 41). Somit lässt sich postulieren, dass der N-Terminus von *S.c.*Stt3 zwischen der 2. und 7. Transmembranspanne Determinanten enthält, die das Protein für die Rekrutierung in den Komplex benötigt. Ob diese an Interaktionen mit anderen Untereinheiten des OST-Komplexes oder mit der C-terminalen, luminalen Domäne von *S.c.*Stt3 beteiligt sind, bleibt zu beweisen. Determinanten im ersten ER-lokalisierten *Loop* scheinen in die Generierung einer aktiven Oligosaccharyltransferase involviert zu sein. CPY-Analysen belegten, dass in den Komplex inkorporiertes *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM) katalytisch nicht aktiv ist (Abb. 40). Durch Angleichung einzelner Aminosäuren des ersten luminalen, menschlichen *Loops* von *H.s.*(TM₂)::*S.c.*(₂TM) an die konservierte Sequenz von Stt3 aus Hefe und Maus konnten keine Determinanten identifiziert werden, die an der Bildung einer funktionellen OST beteiligt sind (Abb. 43).

3.6 Rekonstitution von Komponenten des OST-Komplexes in PE-Vesikeln

Um die katalytische Aktivität von Stt3 nachzuweisen, sollte die Untereinheit aus *S. cerevisiae* heterolog in *E. coli* sowie in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem exprimiert werden. Da sich schnell herauskristallisierte, dass Stt3 allein keine katalytische Aktivität besitzt, wurden zwei essentielle OST-Komplexuntereinheiten Ost1 und Wbp1 co-exprimiert. Aufgrund ihrer Topologie könnten sie über die luminalen Domänen mit dem C-Terminus von Stt3 interagieren und auf diese Weise einen katalytisch aktiven Minimalkomplex generieren. In Vorversuchen wurde zunächst ein System etabliert, in welchem die OST aus der Bäckerhefe nach Solubilisierung in PE-Vesikel enzymatisch aktiv rekonstituiert wurde. Durch

ZUSAMMENFASSUNG

Integration in die Liposomen konnte eine deutliche Stabilisierung des Solubilisats durch gesteigerte OST-Aktivität erzielt werden (Tab. 16).

Obwohl nachweislich alle drei Komponenten des OST-Komplexes in PE-Vesikel integriert waren, konnte keine katalytische Aktivität des Minimalkomplexes gemessen werden (2.8.2; 2.8.3). Es bleibt zu spekulieren, ob eine abweichende Faltung der Proteine bei Expression in *E. coli* oder im Reticulocyten Lysat hierfür verantwortlich ist. Zudem kann nicht ausgeschlossen, dass die fehlende Glykosylierung der Polypeptide bei der heterologen Expression in diesen Systemen der Grund hierfür ist.

4. Materialien

4.1 Chemikalien und Enzyme

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen Becton Dickinson, Greiner, Sarstedt sowie Schleicher & Schuell und Schott.

Folgende Firmen lieferten:

Amersham LIFE SCIENCE (Braunschweig)
Amplify™-Lösung, [³⁵S]-Methionin/Cystein

Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Schweden)
Protein A Sepharose CL-4B

Amersham Pharmacia Biotech Inc. (NJ, USA)
ECL und ECLPlusWestern Blotting Detection System, GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, RNAgard™ RNase Inhibitor

Bio101 (Vista, USA)
CSM-drop-out-Medien

BioRad (Richmond, USA)
Bromphenolblau, Coomassie "Brilliant Blue" G250, Proteinmolekulargewichtsstandard Precision Plus Protein™ Standard sowie "Low Range" Standard

Braun Biotech International (Melsungen)
Glasperlen Ø 0.4-0.6mm

Calbiochem
1-Deoxyojirimycinhydrochlorid, Nonidet P40 (protein grade), G418 Sulfat

Difco (Sparks, USA)
Bacto Agar, Bacto Peptone, Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

Domimed
Fuji Röntgenfilme RX 100

Eurogentec (Seraing, Belgien)
Synthetische Peptide

Fermentas (Vilnius, Litauen)
DNA-Größenstandard EcoRI/HindIII geschnittene λ-DNA, 100 bp ladder plus, IPTG, X-Gal

Finnzymes
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

MATERIALIEN

Fluka Chemie (Buchs)

LiAc, Octylglukosid, PEG4000, Ponceau S-Lösung

Gibco (Gaithersburg, USA)

Pferdeserum

Heirler Cenovis (Radolfzell)

Magermilchpulver

IBA (St. Louis, USA)

Strep-Tactin[®] HRP conjugate, *Strep-tag*[®] Starter Kit

Interchim (France)

Coo Protein Assay Reagent

Invitrogen (San Diego, USA)

NativePAGE[™] Cathode Buffer, NativePAGE[™] Novex[®] 4-16% Bis-Tris Gel, NativePAGE[™] Running Buffer Kit, NativePAGE[™] Sample Prep Kit, NativeMark[™] Unstained Protein Standard, NuPAGE[®] Transfer Buffer, Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit

Kodak (Rochester, USA)

BioMaxTM MR Röntgenfilm

Macherey-Nagel (Düren)

NucleoBond[®] PC100 Kit

Millipore

Immobilon-P Transfermembran (PVDF)

MoBiTec

Anti-CPY Antikörper (*CPY monoclonal antibody*)

MWG Biotech (Ebersberg)

Synthetische Oligonukleotide

New England Biolabs (Beverly, USA)

Alkalische Phosphatase, BSA, Restriktionsenzyme und -puffer, T4 DNA Ligase, Quick LigationTM Kit

Nikko Chemicals (Japan)

Nikkol BL-8SY

PeqLab (Erlangen)

peqGOLD Gel Extraction Kit, peqGOLD Universal Agarose, dNTPs, Elektroporationsküvetten, Proteinmolekulargewichtsstandard Protein MW Marker

Pierce (Rockford, USA)

Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent, *SuperSignal*[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Triton X-100

MATERIALIEN

Promega

TNT[®] SP6/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System

Qiagen (Hilden)

MinEluteTM Gel Extraction Kit, MinEluteTM Rxn Cleanup Kit, Ni-NTA Agarose, QIAGEN[®] PCR Cloning^{plus} Kit, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, QIAquick[®] Gel Extraction Kit, QIAquick[®] PCR Purification Kit, Taq DNA Polymerase

Roche (Mannheim)

Ampicillin, Benzamidin, Ethidiumbromid, PMSF, RNase A

Roth (Karlsruhe)

Acrylamid-/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (30/0.8%, w/v) für Proteingele, Ethanol, Phenol, Rotiszint[®] ecoplus

Seikagaku Kogyo (Tokio, Japan)

Zymolyase 100T (100.000 U/g) aus *Arthrobacter luteus*

Serva (Heidelberg)

Ammoniumperoxidsulfat, Dialyseschlauch Servapore, DTT, Kanamycin, SDS (Na-Salz), TEMED

Sigma (Deisenhofen)

Aminosäuren, anti-Flag[®] M2 monoclonal antibody (*whole molecule*), anti-mouse IgG-HRP (*whole molecule*), anti-rabbit IgG-HRP (*whole molecule*), Caffeine, Desoxyribojirimycin, Digitorin, Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor white M2R), Lachssperm-DNA (*single stranded*), Lachssperm-DNA Typ II (Na-Salz), Phosphatidylethanolamin, Triton X-100, Tween 20

Sigma-Genosys

Synthetische Peptide

Stratagene (La Jolla, USA)

Pfu Turbo[®] Hotstart DNA Polymerase, Quick Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, Quick Change[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Thermo Hybaid (Ulm)

Synthetische Oligonukleotide

USB (Cleveland, USA)

Tris

Whatman (Maidstone, England)

3MM Chromatographiepapier

4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

4.2.1 Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21 [DE3]	F ⁻ <i>ompT hsdS^B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, USA
DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG</i>	BRL TM Grant et al. (1990)
M15 [pREP4]	F ⁻ <i>thi-1 lac⁻ gal⁺ ara⁺ mtl⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺ (Kan^R)</i>	Qiagen, Hilden
SG13009 [pREP4]	F ⁻ <i>thi-1 lac⁻ gal⁺ ara⁺ mtl⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺ (Kan^R)</i>	Qiagen, Hilden
TOP 10 F'	F ['] {lacIQ Tn10 (Tet ^R)} <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS mcr BC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) nupG</i>	Invitrogen, USA
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z ΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Bullock et al. (1987)

Tab. 16: *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Δalg3 (YBL082c)	BY4741 Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YBL082c::KanMX4	Euroscarf, Frankfurt a.M.
Δalg5 (YPL227c)	BY4741 Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL227c::KanMX4	Euroscarf, Frankfurt a.M.
Δalg6 (YOR002w)	BY4741 Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YOR002w::KanMX4	Euroscarf, Frankfurt a.M.
Δalg9 (YNL219c)	BY4741 Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YNL219c::KanMX4	Euroscarf, Frankfurt a.M.
RKY327	Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 Δost3::HIS3 Δost6	dieses Labor
RKY327 Stt3 ^{ZZ}	Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 Δost3::HIS3 Δost6 STT3-ZZ	diese Arbeit
SS328	Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801	Vijayraghavan et al. (1989)
SS328 Stt3 ^{ZZ}	Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 STT3-ZZ	diese Arbeit
STT3/Δstt3 (Y24390)	BY4743 MAT _a /a his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 YGL022w::KanMX4/YGL022w	Euroscarf, Frankfurt a.M.
stt3-7	MAT _a ade2-101 ura3-52 his3Δ200 leu2 lys2-801 stt3-7	Spirig et al. (1997)
W303 a/α	Mata/α ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100	Thomas et al. (1989)
X2180-1A	Mata SUC2 mal mel gal2 CUP1	Genetic Stock Center, Berkley
YG157	Mata ade2-101 lys2-801 URA3:GAL1-STT3 Δstt3::HIS3 his3Δ200	Zufferey et al. (1995)

Tab. 17: Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

MATERIALIEN

4.2.2 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
IRAT p970	<i>H.s.STT3-A</i> Vollängen-cDNA-Klon <i>bla</i>	RZPD, Berlin
NEV-N-leu	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, CEN4, LEU2</i>	Sauer und Stolz (1994)
pASK-IBA2	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid	IBA
pBS	Vektor für Zwischenklonierungen	Stratagene
pCR®-BluntII-TOPO®	Vektor für Zwischenklonierungen	Invitrogen
pDrive	Vektor für Zwischenklonierungen	Qiagen
PRS406	Integratives Plasmid für <i>S. cerevisiae</i>	Christianson <i>et al.</i> (1992)
pTNT	Expressionsplasmid für <i>in vitro</i> Transkription & Translation	Promega
pUC19	Vektor für Zwischenklonierungen	New England Biolabs
pUG6	Vektor mit KanMX-Marker zur Disruption von Genen	Wach <i>et al.</i> (1994)
pVT100-U	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, 2μ, URA3</i>	Vernet <i>et al.</i> (1987)
pVT100-ZZ	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid mit Protein A-Epitop <i>ori, bla, 2μ, URA3</i>	Vernet <i>et al.</i> (1987) ; verändert nach Jürgen Stolz
pYES Cup1 H-Flag-K	Derivat des Vektors pYES2/NT C (Invitrogen); Austausch des Gal- Promotors mit Kupfer-Promotor aus pYEX (Clontech); Insertion eines N- terminalen Flag-Epitops in <i>HindIII</i> - <i>KpnI</i> -Schnittstelle	Françoise Routier, Hannover
pZZ-Kan	Vektor mit 2 Domänen des Protein A- Epitops und KanMX-Marker (genomische Epitopmarkierung)	Jungmann und Munro (1998); verändert durch Jürgen Stolz

4.2.3 Konstruierte Plasmide

Plasmide mit *S.c.Stt3*

Vor Klonierung sämtlicher Konstrukte mit *S.c.Stt3* wurde durch zielgerichtete Mutagenese die interne *BamHI*-Schnittstelle (ab bp 4) beseitigt. *S.c.STT3*-Gen bp 1-2157

Expression in	Vektor	Schnittstellen	aa/bp von bis
<i>E. coli</i>	pASK-IBA2	5'- <i>PstI</i> ; 3'- <i>PstI</i>	bp 7-2154 ohne cleavage sites, ohne Stopp-Codon
<i>S. cerevisiae</i>	NEV-N-leu	5'- <i>NotI</i> ; 3'- <i>NotI</i>	bp 1-2157
			+ Mutagenese D494A
			+ Mutagenese D508A
			+ Mutagenese D582A
			+ Mutagenese D583A
			bp135-2157 von <i>S.c.STT3</i>
			bp135-2157 von <i>S.c.STT3</i> mit D494A
			bp135-2157 von <i>S.c.STT3</i> mit D582A
			bp135-2157 von <i>S.c.STT3</i> mit D583A
	pVT100-ZZ	5'- <i>HindIII</i> ; 3'- <i>BamHI</i>	bp 1-2154, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>BamHI</i> ; 3'- <i>XbaI</i>	bp 4-2157, ohne Start-Codon
<i>in vitro TNT</i>	pTNT	5'- <i>NotI</i> ; 3'- <i>NotI</i>	bp 7-2157 ohne cleavage sites

Plasmide mit *C.j.PGLB*

Vor Klonierung sämtlicher Konstrukte mit *C.j.PGLB* wurde durch zielgerichtete Mutagenese die interne *Xba*I-Schnittstelle (ab bp 2108) beseitigt.
C.j.PGLB-Gen bp 1-2142

Expression in	Vektor	Schnittstellen	aa/bp von bis
<i>S. cerevisiae</i>	pVT100-ZZ	5'- <i>Pvu</i> II; 3'- <i>Bam</i> HI	bp 1-2139, ohne Stop-Codon + Mutagenese C245A + Mutagenese V451E + Mutagenese R496Q + Mutagenese DNNTWNNT (ab aa 476) + Mutagenese T146A + Mutagenese T313A + Mutagenese S535I

Plasmide mit *L.m.STT3*

Vor Klonierung sämtlicher Konstrukte mit *L.m.2191* wurden durch zielgerichtete Mutagenese die interne *Xho*I-Schnittstelle (ab bp 1878) beseitigt.
L.m.2191-Gen bp 1-2559, *L.m.2192*-Gen bp 1-2484, *L.m.2193*-Gen bp 1-2460, *L.m.2194*-Gen bp 1-2574

Expression in	Vektor	Schnittstellen	aa/bp von bis	
<i>S. cerevisiae</i>	pVT100-ZZ	5'- <i>Hind</i> III; 3'- <i>Bam</i> HI	bp 1-2556, ohne Stop-Codon	
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>Bam</i> HI; 3'- <i>Xba</i> I	bp 4-2559, ohne Start-Codon	<i>L.m.2191</i>
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>Bam</i> HI; 3'- <i>Xba</i> I	bp 4-2484, ohne Start-Codon	<i>L.m.2192</i>
	pVT100-ZZ	5'- <i>Hind</i> III; 3'- <i>Bam</i> HI	bp 1-2457, ohne Stop-Codon	
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>Bam</i> HI; 3'- <i>Xba</i> I	bp 4-2460, ohne Start-Codon	<i>L.m.2193</i>
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>Bam</i> HI; 3'- <i>Xba</i> I	bp 4-2574, ohne Start-Codon	<i>L.m.2194</i>

Plasmide mit *H.s.STT3-A*

Vor Klonierung sämtlicher Konstrukte mit *H.s.STT3-A* wurden durch zielgerichtete Mutagenese die internen Schnittstellen *Hind*III (ab bp 55), *Bam*HI (ab bp 1002) und *Xho*I (ab bp 1656) beseitigt.

H.s.STT3-A-Gen bp 1-2118

Expression in	Vektor	Schnittstelle	aa/bp von bis
<i>S. cerevisiae</i>	pVT100-U	5'- <i>Xba</i> I; 3'- <i>Xba</i> I	bp 1-2118
	pVT100-ZZ	5'- <i>Hind</i> III; 3'- <i>Bam</i> HI	bp 1-2115, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'- <i>Bam</i> HI; 3'- <i>Xba</i> I	bp 4-2118, ohne Start-Codon

Plasmide mit *S.c.OST1* und *S.c.WBP1*

S.c.OST1-Gen bp 1-1431, *S.c.WBP1*-Gen bp 1-1293

Expression in	Vektor	Schnittstelle	aa/bp von bis	
<i>E. coli</i> <i>in vitro TNT</i>	pASK-IBA2	5'- <i>Pst</i> I; 3'- <i>Pst</i> I	bp 67-1429, ohne cleavage sites, ohne Stopp-Codon	<i>OST1</i>
	pTNT	5'- <i>Not</i> I; 3'- <i>Not</i> I	bp 67-1431, ohne cleavage sites	
<i>E. coli</i> <i>in vitro TNT</i>	pASK-IBA2	5'- <i>Kpn</i> ; 3'- <i>Kpn</i> I	bp 67-1290, ohne cleavage sites, ohne Stopp-Codon	<i>WBP1</i>
	pTNT	5'- <i>Not</i> I; 3'- <i>Not</i> I	bp 67-1293, ohne cleavage sites	

Plasmide mit Fusionen aus *S.c.STT3* mit *C.j.PGLB*, *L.m.STT3* und *H.s.STT3-A*

Bezeichnung	Vektor	Schnittstellen	aa/bp von bis
<i>S.c.(TM)::C.j.(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1386, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>C.j.PGLB</i> bp 1300-2139, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon + DNNTWNNT (ab aa 476 in <i>C.j.PGLB</i>)
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1386, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>C.j.PGLB</i> bp 1300-2139, 5'-XhoI; 3'-XbaI + DNNTWNNT (ab aa 476 in <i>C.j.PglB</i>)
<i>S.c.(TM_{WWD})::C.j.(wwdC_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1536, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>C.j.PGLB</i> bp 1368-2139, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon + DNNTWNNT (ab aa 476 in <i>C.j.PglB</i>)
<i>S.c.(TM)::L.m.2191(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1386, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>L.m.2191</i> bp 1792-2556, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 4-1386, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2191</i> bp 1792-2559, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>S.c.(TM_{WWD})::L.m.2191(wwdC_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1536, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>L.m.2191</i> bp 1936-2556, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 4-1536, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2191</i> bp 1936-2559, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>S.c.(TM_{WWD})::L.m.2193(wwdC_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1536, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>L.m.2193</i> bp 1756-2457, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 4-1536, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2193</i> bp 1756-2460, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>L.m.2191(TM)::S.c.(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 1-1791, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>S.c.STT3</i> bp 1387-2154, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 4-1791, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>S.c.STT3</i> bp 1387-2157, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>L.m.2191(TM_{WWD})::S.c.(wwdC_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 1-1935, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>S.c.STT3</i> bp 1537-2154, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon

	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 4-1935, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>S.c.STT3</i> bp 1537-2157, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>L.m.2191(TM_{WWD})::L.m.2193(WWD C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 1-1935, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>L.m.2193</i> bp 1756-2457, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 4-1935, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2193</i> bp 1756-2460, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>L.m.2191(TM)::L.m.2193(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 1-1791, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>L.m.2193</i> bp 1618-2457, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 4-1791, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2193</i> bp 1618-2460, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>L.m.2191(TM₇₅₀)::L.m.2193(719C_{ter})</i>	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>L.m.2191</i> bp 4-2250, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>L.m.2193</i> bp 2154-2460, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>S.c.(TM)::H.s.(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-PstI-BamHI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 1-1386, 5'-HindIII; 3'-PstI <i>H.s.STT3-A</i> bp 1414-2115, 5'-PstI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-PstI-XbaI-3'	<i>S.c.STT3</i> bp 4-1386, 5'-BamHI; 3'-PstI, ohne Start-Codon <i>H.s.STT3-A</i> bp 1414-2118, 5'-PstI; 3'-XbaI
<i>H.s.(TM)::S.c.(C_{ter})</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 1-1413, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>S.c.STT3</i> bp 1389-2154, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 4-1413, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>S.c.STT3</i> bp 1389-2157, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>H.s.(TM₂)::S.c.(2TM)</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 1-351, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>S.c.STT3</i> bp 357-2154, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon + Mutagenese G108 + Mutagenese H69L + Mutagenese H107L + Mutagenese E119F + Mutagenese T109P
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 4-351, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>S.c.STT3</i> bp 357-2157, 5'-XhoI; 3'-XbaI
<i>H.s.(TM₇)::S.c.(7TM)</i>	pVT100-ZZ	5'-HindIII-XhoI-BamHI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 1-930, 5'-HindIII; 3'-XhoI <i>S.c.STT3</i> bp 936-2154, 5'-XhoI; 3'-BamHI, ohne Stopp-Codon
	pYES-Cup1 H-Flag-K	5'-BamHI-XhoI-XbaI-3'	<i>H.s.STT3-A</i> bp 4-930, 5'-BamHI; 3'-XhoI, ohne Start-Codon <i>S.c.STT3</i> bp 936-2157, 5'-XhoI; 3'-XbaI

4.2.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
STT3 pVT100 HindIII 5fw (34 Nukleotide)	cccaagctggATGGGcTCCGACCGGTCGTGTG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> mit 5'-HindIII-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 ganz pVT100 BamHI 3rev (34 Nukleotide)	cgcggatccGACTCTCAAGCCTAATTCAAGGTCTC	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ohne Stopp-Codon mit 3'-BamHI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 Sc -ATG BamHI 5fw Flag (28 Nukleotide)	cgcggatccGGCTCCGACCGGTCGTGTG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ohne Start-Codon mit 5'-BamHI-Site zur Klonierung in pYES
STT3 Sc +Stop XbaI 3rev Flag (Nukleotide)	gtctagaGACTCTCAAGCCTAATTCAAGG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> mit Stopp-Codon mit 3'-XbaI-Site zur Klonierung in pYES
STT3 Sc ab TM2 APL Xho fw (26 Nukleotide)	ccgctcgagGCGCCACTATTTCTGG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ab TM2 (aa 119) mit 5'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 Sc ab TM7 GLS Xho fw (24 Nukleotide)	ccgctcgagGGACTTCTGCCTTG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ab TM7 (aa 312) mit 5'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 Sc WWD Xho fw (23 Nukleotide)	ccgctcgagTGGTGGGATTACGG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> WWD _{C_{ter}} (aa 516-Stopp) mit 5'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 switch XhoI fw (27 Nukleotide)	ccgctcgagGTCTTCCATTCTACTTGG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> C _{ter} (aa 463-Stopp) mit 5'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 switch VAA XhoI rev (30 Nukleotide)	ccgctcgagCGCTGCAACCTTACTGTCCTC	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> TM _{WWWD} (aa 1-515) mit 3'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 switch YLF XhoI rev (31 Nukleotide)	ccgctcgagGAAAAGATAGAAATAAAAGATG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> TM (aa 1-465) mit 3'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3 Hefe YLF TM PstI rev (34 Nukleotide)	cgtttctgcagGAAAAGATACAAATAAAAGATG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> TM (aa 1-465) mit 3'-PstI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
D494A fw (35 Nukleotide)	GTAAATTGGCGTTGATGCCGACTTCAGGGAGCG	Einführung der Mutation D494A in <i>S.c.STT3</i>
D494A rev (35 Nukleotide)	CGCTTCCCTGAAGTCGGCGATCACGCCAATTAC	Einführung der Mutation D494A in <i>S.c.STT3</i>
D508A fw (35 Nukleotide)	GTAAAGAATGAACCTGCTGAGGACAGTAAGGTTG	Einführung der Mutation D508A in <i>S.c.STT3</i>
D508A rev (35 Nukleotide)	CAACCTTACTGTCCTCAGCAGAGTTCAATTCTAAC	Einführung der Mutation D508A in <i>S.c.STT3</i>
D582A fw (36 Nukleotide)	CTAATTGGGTTGGTGGTCTGACATCAACAATTAC	Einführung der Mutation D582A in <i>S.c.STT3</i>
D582A rev (36 Nukleotide)	GAATTGTTGATGTCAGCACCACCAAACCCAATTAG	Einführung der Mutation D582A in <i>S.c.STT3</i>

D583A fw (33 Nukleotide)	GGGTTGGTGGTGATGCCATCAACAAATTCT TG	Einführung der Mutation D583A in <i>S.c.STT3</i>
D583A rev (33 Nukleotide)	CAAGAATTGTTGATGGCATGACCACCAAAC CC	Einführung der Mutation D583A in <i>S.c.STT3</i>
STT3-ZZ Kan 3rev (65 Nukleotide)	CGATCCGTCACGAGCGATCATAATAACGGGA AGGGAAACCAAACCTATAACgggtcgacgggtatcg	C-terminale Epitopmarkierung von <i>S.c.STT3</i> mit 2 Domänen Protein A
STT3-ZZ Kan 5fw (58 Nukleotide)	CCAGAACCTCCATAAAGAGACCTGAATTAGG CTTGAGAGTCggagcaggggcgggtgc	C-terminale Epitopmarkierung von <i>S.c.STT3</i> mit 2 Domänen Protein A
STT3 yeast 5 fw Not (29 Nukleotide)	agcgccgcATGGGATCCGACGGTCGTG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ohne cleavage sites (ab bp 7) mit 5'- <i>NotI</i> -Site zur Klonierung in pTNT
STT3 yeast 3rev Not (33 Nukleotide)	ageggccgcTTAGACTCTCAAGCCTAATTCAAGG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> mit 3'- <i>NotI</i> -Site zur Klonierung in pTNT
STT3 pASK PstI 5fw (35 Nukleotide)	cgcaactcgaggatCCGACCGGTCGTGTGTTTG	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ohne cleavage sites (ab bp 7) und Start-Codon mit 5'- <i>PstI</i> -Site zur Klonierung in pASK-IBA2
STT3 pASK PstI 3rev (Nukleotide)	gcgttctcgaggatCTCTCAAGCCTAATTCAAGGCTC	Amplifikation von <i>S.c.STT3</i> ohne Stopp-Codon mit 3'- <i>PstI</i> -Site zur Klonierung in pASK-IBA2
Lmajor 2191 Hind fw (23 Nukleotide)	ccaagcttATGCCGGCCAAGAAC	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> mit 5'- <i>HindIII</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2191 ISS Xho fw (ab TM) (24 Nukleotide)	ccgctcgagATCAGCTCAGCGTAC	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> C _{ter} (aa 597-Stopp) mit 5'- <i>XhoI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2191 L626I fw (35 Nukleotide)	GATAGTGAAGGACTACaTCGAGGCCTACGAG TGGC	Einführung der Mutation L626I in <i>L.m.2191</i> (Eliminierung der internen <i>XhoI</i> -Schnittstelle)
Lmajor 2191 L626I rev (35 Nukleotide)	GCCACTCGTAGGCCTCGAtGTAGCCTTCACT ATC	Einführung der Mutation L626I in <i>L.m.2191</i> (Eliminierung der internen <i>XhoI</i> -Schnittstelle)
Lmajor 2191 LSC Xho rev (bis TM) (25 Nukleotide)	ccgctcgagGCATGAGAGGTGGAAG	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> TM (aa 1-596) mit 3'- <i>XhoI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2191 VLA Xho rev (bis WWD) (24 Nukleotide)	ccgctcgagGGCCAAAACGCGCGC	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> TM _{WWD} (aa 1-644) mit 3'- <i>XhoI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2191 Voll Bam rev (19 Nukleotide)	cggatccCGCCTTGTGGTG	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> ohne Stopp-Codon mit 3'- <i>BamHI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2191 WWD Xho fw (ab WWD) (24 Nukleotide)	ccgctcgagTGGTGGGACTACGGC	Amplifikation von <i>L.m.2191</i> _{WWDC_{ter}} (aa 645-Stopp) mit 5'- <i>XhoI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ

Lmajor 2191 MMR Xho rev (26 Nukleotide)	ccgctcgagCCGCATCATGGCGTTG	Amplifikation von <i>L.m.</i> 2191 TM ₇₅₀ (aa 1-750) mit 3'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2193 Voll Bam rev ohne Stop (23 Nukleotide)	cgcggatccGCGCCTGCTCCCGC	Amplifikation von <i>L.m.</i> 2193 ohne Stop-Codon mit 3'- <i>Bam</i> HI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2193 WWD Xho fw (24 Nukleotide)	ccgctcgagTTGTTGGACTACGGC	Amplifikation von <i>L.m.</i> 2193 WWDC _{ter} (aa 585-Stopp) mit 5'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2193 SLI Xho fw (25 Nukleotide)	ccgctcgagTCGCTCATATATCACC	Amplifikation von <i>L.m.</i> 2193 C _{ter} 719 (aa 719-Stopp) mit 5'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Lmajor 2193 SRK Xho fw (21 Nukleotide)	ccgctcgagTCGCGCAAGATG	Amplifikation von <i>L.m.</i> 2193 C _{ter} (aa 540-Stopp) mit 5'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
OST1 pASK PstI 3rev (34 Nukleotide)	gcgttctcgagGTTAGTTACGTTCATGTTCAAAG	Amplifikation von <i>S.c.</i> OST1 ohne Stop-Codon mit 3'- <i>Pst</i> I-Site zur Klonierung in pASK-IBA2
OST1 pASK PstI 5fw (32 Nukleotide)	cgcaactcgagGCCAATACGAGCCACCTGCG	Amplifikation von <i>S.c.</i> OST1 ohne cleavage sites (ab bp 67) und Start-Codon mit 5'- <i>Pst</i> I-Site zur Klonierung in pASK-IBA2
OST1 yeast Not 3rev (28 Nukleotide)	agcgccgcTCAGTTAGTTACGTTCATG	Amplifikation von <i>S.c.</i> OST1 mit 3'- <i>Not</i> I-Site zur Klonierung in pTNT
OST1 yeast Not 5fw (29 Nukleotide)	agcgccgcATGGCCAATACGAGCCACC	Amplifikation von <i>S.c.</i> OST1 ohne cleavage sites (ab bp 67) mit 5'- <i>Not</i> I-Site zur Klonierung in pTNT
PGLB Cjej pVT PvuII fw (38 Nukleotide)	gcgtagctgATGTTAAAAAAAGAGTATTAAAAAA ACCC	Amplifikation von <i>C.j.</i> PGLB mit 5'- <i>Pvu</i> II-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
PGLB Cjej pVT BamHI rev (33 Nukleotide)	cgcggatccATTAAAGTTAAAAACCTTAGC	Amplifikation von <i>C.j.</i> PGLB ohne Stopcodon mit 3'- <i>Bam</i> HI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Cjej PGLB switch SQN XhoI fw (26 Nukleotide)	ccgctcgagTCTCAAAATGAAGCATC	Amplifikation von <i>C.j.</i> PGLB C _{ter} (aa 434-713) mit 5'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Cjej PGLB switch WWD XhoI fw (29 Nukleotide)	ccgctcgagTGGTGGATTATGGTTATCC	Amplifikation von <i>C.j.</i> PGLB WWDC _{ter} (aa 457-713) mit 5'- <i>Xho</i> I-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
Cjej C425Y fw (35 Nukleotide)	CCAGTATTATCCATATTaCAACTATAAAGC GCC	Einführung der Mutation C425Y in <i>C.j.</i> PGLB
Cjej C425Y rev (35 Nukleotide)	GGCGCTTATAGTTGtAAATATGGATAAATAC TGG	Einführung der Mutation C425Y in <i>C.j.</i> PGLB
Cjej PglB S535I fw (38 Nukleotide)	GATGAAAGATTATAATCAAAtCAATGTGGAT TTGTTTC	Einführung der Mutation S535I in <i>C.j.</i> PGLB

Cjej PglB S535I rev (38 Nukleotide)	GAAACAAATCCACATTGATTGATTATAATC TTTCATC	Einführung der Mutation S535I in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej PglB T146A fw (40 Nukleotide)	GCAAACAGTTATTATAATCGCgCTATGAGTG GGTATTATG	Einführung der Mutation T146A in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej PglB T146A rev (40 Nukleotide)	CATAATACCCACTCATAGCGcGATTATAATA ACTGTTGC	Einführung der Mutation T146A in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej PglB T313A fw (41 Nukleotide)	GTATTAAATGTCAATCAAgCCATACAAGAA GTTGAAAATG	Einführung der Mutation T313A in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej PglB T313A rev (41 Nukleotide)	CATTTCAACTTCTTGTATGGcTTGATTGACA TTAAAATAC	Einführung der Mutation T313A in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej R496Q fw (38 Nukleotide)	GCTTTAAGCAAAGATGAACaAGCTGCGGCTA ATATGGC	Einführung der Mutation R496Q in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej R496Q rev (38 Nukleotide)	GCCATATTAGCCGAGCTtGTTCATCTTGCT TAAAGC	Einführung der Mutation R496Q in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej V451E fw (30 Nukleotide)	GCCAATAGAGaAGATTATGTGGTAACTTGG	Einführung der Mutation V451E in <i>C.j.PGLB</i>
Cjej V451E rev (30 Nukleotide)	CCAAGTTACCACATAATCTtCTCTATTGGC	Einführung der Mutation V451E in <i>C.j.PGLB</i>
ura3::KanMX fw (74 Nukleotide)	GTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCT ACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCcagctgaagctc gtacgc	Disruption des <i>URA3</i> -Gens mit einer Kan-Kassette im Stamm YG157
ura3::KanMX rev (79 Nukleotide)	TTAGTTTGCTGGCCGCATCTTCTCAAATATG CTTCCCAGCCTGCTTTCTGTAACGGCATAG Gccactagtggatctg	Disruption des <i>URA3</i> -Gens mit einer Kan-Kassette im Stamm YG157
WBP1 pASK KpnI 5fw (34 Nukleotide)	cgggttaccACTTCAAGAACGCTTGTCTTTACG	Amplifikation von <i>S.c.WBP1</i> ohne cleavage sites (ab bp 67) und Start-Codon mit 5'- <i>KpnI</i> -Site zur Klonierung in pASK-IBA2
WBP1 pASK KpnI 3rev (26 Nukleotide)	gccggtaccGTTGTTTTTTGAATG	Amplifikation von <i>S.c.WBP1</i> ohne Stopp-Codon mit 3'- <i>KpnI</i> -Site zur Klonierung in pASK-IBA2
WBP1 yeast Not 5fw (28 Nukleotide)	agcgccgcATGACTTCAAGAACGCTTG	Amplifikation von <i>S.c.WBP1</i> ohne cleavage sites (ab bp 67) mit 5'- <i>NotI</i> -Site zur Klonierung in pTNT
WBP1 yeast Not 3rev (29 Nukleotide)	agcgccgcTTAGTTGTTTTGAATG	Amplifikation von <i>S.c.WBP1</i> mit 3'- <i>NotI</i> -Site zur Klonierung in pTNT
STT3-A Hind fw (23 Nukleotide)	ccaaagttATGACTAAGTTGG	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> mit 5'- <i>HindIII</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3-A pVTZZ Voll BamHI rev (27 Nukleotide)	cgcggatccTGCCTTGACAAGCCTCG	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> ohne Stopp-Codon mit 3'- <i>BamHI</i> -Site zur Klonierung in pVT100-ZZ

STT3-A pVT XbaI fw (31 Nukleotide)	gctctagaATGACTAAGTTGGATTTGCG	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> mit 5'-XbaI-Site zur Klonierung in pVT100-U
STT3-A pVT XbaI rev mit Stop (29 Nukleotide)	gctctagaTTATGTCCTTGACAAGCCTCG	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> mit Stopp-Codon mit 3'-XbaI-Site zur Klonierung in pVT100-U sowie pYES
STT3-A -ATG BamHI 5fw Flag (27 Nukleotide)	cgcggatccGGCTCCGACCGGTCGTGTG	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> ohne Start-Codon mit 5'-BamHI-Site zur Klonierung in pYES
STT3-A Hs bis TM2 VCV Xho rev (23 Nukleotide)	ccgctcgagCACACAGACATTCC	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> bis TM2 (aa 1-117) mit 3'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3-A Hs bis TM7 FVL Xho rev (24 Nukleotide)	ccgctcgagAAGGACAAAGCCTAC	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> bis TM7 (aa 1-310) mit 3'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3-A ITY TM XhoI rev (31 Nukleotide)	ccgctcgagGTAGGTGATGAGAAAGAAAGCC	Amplifikation von <i>H.s.STT3-A</i> TM (aa 1-471) mit 3'-XhoI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3-A TFH Cter PstI fw (30 Nukleotide)	cgcttctgcagACCTTCATTCAACCTGG	Amplifikation von C _{ter} (aa 472-Stopp) mit 5'-PstI-Site zur Klonierung in pVT100-ZZ
STT3-A Hs T60A fw (32 Nukleotide)	CACACTTGAAGCTACTCATTCTGTCAATG G	Einführung der Mutation T60A in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen HindIII-Schnittstelle)
STT3-A Hs T60A rev (32 Nukleotide)	CCATTGACAGAACATGAGTAGCTTCAAAAGTGT G	Einführung der Mutation T60A in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen HindIII-Schnittstelle)
STT3-A T1005C 5fw (31 Nukleotide)	CTACTCGCTGCTGGACCCCTTTATGCTAAG	Einführung der Mutation T1005C in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen BamHI-Schnittstelle)
STT3-A T1005C 3rev (31 Nukleotide)	CTTAGCATAAGAGGGGTCCAGCAGCGAGTA G	Einführung der Mutation T1005C in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen BamHI-Schnittstelle)
STT3-A C1750A 5fw (29 Nukleotide)	CCCATATTCTAGAGTAGGGCAGGCAATG	Einführung der Mutation C1750A in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen XhoI-Schnittstelle)
STT3-A C1750A 3rev (29 Nukleotide)	CATTGCCTGCCCTACTCTAGAAATATGGG	Einführung der Mutation C1750A in <i>H.s.STT3-A</i> (Eliminierung der internen XhoI-Schnittstelle)
STT3-A +G108 5fw (35 Nukleotide)	CTCCATTTCACGGTATCACCATCGACAT TCG	Einführung der Aminosäure G108 in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A +G108 3rev (35 Nukleotide)	CGAATGTCGATGGTATACCGTGGAAAAAT GGAG	Einführung der Aminosäure G108 in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A T109P 5fw (34 Nukleotide)	CATTTTCCACATCCCCATCGACATTGGAA TG	Einführung der Mutation T109P in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A T109P 3rev (34 Nukleotide)	CATTCCGAATGTCGATGGGGATGTGGAAAAA ATG	Einführung der Mutation T109P in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A H69L 5fw (35 Nukleotide)	GGGTTTATAAATTCTGAACCTGGTTGATG ACCG	Einführung der Mutation H69L in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A H69L 3rev (35 Nukleotide)	CGGTCATCAAACCAAGTTCAAGAATTATAAA ACCC	Einführung der Mutation H69L in <i>H.s.STT3-A</i>

STT3-A E119F 5fw (32 Nukleotide)	GTCTGTGCTCTTGCGCCACTATTTCTGG	Einführung der Mutation E119F in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A E119F 3rev (32 Nukleotide)	CCAGAAAATAGTGGCGCAAAGAGCACACAG AC	Einführung der Mutation E119F in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A H107L 5fw (35 Nukleotide)	GTACTCCATTTCCTTGATCACCATCGACAT TCG	Einführung der Mutation H107L in <i>H.s.STT3-A</i>
STT3-A H107L 3rev (35 Nukleotide)	CGAATGTCGATGGTGATCAAGAAAAATGG AGTAC	Einführung der Mutation H107L in <i>H.s.STT3-A</i>

5. Methoden

5.1 Anzuchtbedingungen und Medien

5.1.1 Anzuchtbedingungen für *E. coli*

E. coli wurde bei 37°C als Flüssigkultur in LB-Medium oder auf Platten mit 1.8 % (w/v) Agar angezogen. Je nach Plasmid wurde zur Selektion das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) zugegeben.

Medien

LB-Medium	1 %	Bacto Tryptone (w/v)
	0.5 %	Yeast Extract (w/v)
	1 %	NaCl (w/v)
	± 1.8 %	Bacto Agar (w/v)

5.1.2 Anzuchtbedingungen für *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Zellen wurden bei 30°C, temperatursensitive Stämme bei 25°C angezogen. Die Aufzucht erfolgte für Wildtypstämme, Stämme ohne Plasmid sowie Stämme mit genomisch integriertem Tag im Vollmedium YEPD. Im Falle des Stammes YG157 mit Galaktose induzierbarem Promotor wurden die Zellen in YEPGal (Galaktose) bzw. zur Repression in YEPD (Glukose) kultiviert. Zur Selektion auf Kanamycin wurden die Stämme in YEPD in Gegenwart des Kanamycinderivats G418 angezogen. Selektion von Stämmen mit Plasmid auf Auxotrophiemarker (Leucin oder Uracil) erfolgte in Minimalmedium mit Glukose bzw. Galaktose.

Vollmedien

YEPD (Glukose)	1 %	Yeast Extract (w/v)	YEPGalGalaktose	1 %	Yeast Extract (w/v)
	2 %	Bacto Peptone (w/v)		2 %	Bacto Peptone (w/v)
	2 %	Glukose (w/v)		2 %	Galaktose (w/v)
	± 1.8 %	Bacto Agar (w/v)		± 1.8 %	Bacto Agar (w/v)
	±	G418 (266 mg/l)			

Minimalmedien

YNB drop-out	0.67 %	YNB Yeast Nitrogen Base (w/v)
	0.08 %	Complete Supplement Mixture drop-out leu bzw. ura (w/v)
	2 %	Glukose bzw. Galaktose (w/v)
	± 1.8 %	Bacto Agar (w/v)

METHODEN

YNB CAA	0.67 %	YNB Yeast Nitrogen Base (w/v)
	0.5 %	CAA Casamino acids (w/v)
	2 %	Glukose bzw. Galaktose (w/v)
	± 1.8 %	Bacto Agar (w/v)

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* zu analytischen Zwecken sowie Hefetransformation erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) mittels alkalischer Lyse. 1.5 ml einer ÜN-Kultur in LB-Amp/Kan wurden durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 1 min geerntet. Die Lyse geschah in 100 µl kalter Solution I für 5 min bei RT und 200 µl Solution II auf Eis. Zur Fällung der genomischen DNA sowie Proteine wurden 150 µl Solution III zugegeben, 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 5 min abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA konnte durch Zugabe von 800 µl 98 % Ethanol für 5 min bei RT gefällt werden. Der Niederschlag wurde mit 500 µl 70 %igem EtOH gewaschen, für 15 min in der SpeedVac getrocknet und für ca. 30 min durch Schütteln in 20 µl TE/RNase (20 µg/ml) aufgenommen.

Lösungen

Solution I	50 mM	Glukose	Solution II	0.2 N	NaOH
	10 mM	Na-EDTA		1 %	SDS
	25 mM	Tris-HCl pH 8.0			
Solution III	60 ml	5M K-Acetat	TE	10 mM	Tris-HCl pH 8.0
	11.5 ml	Eisessig		1 mM	Na-EDTA
	ad 100m	H ₂ O bidest			

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen sowie Klonierungen wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits von Qiagen bzw. NucleoBond® PC 100 Kits von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers isoliert.

5.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine in LB-Medium angezogene ÜN-Kultur 1:100 mit frischem, vorgewärmten Medium verdünnt und bei 37°C unter leichtem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀0.5-1 weiter angezogen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen geerntet, das Pellet in vorgekühltem TSS-Medium resuspendiert (100 ml Zellpellet

METHODEN

in 5 ml). Aliquots von 100 bzw. 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrosten, anschließend bei -80°C gelagert.

TSS-Medium	85 %	LB-Medium (v/v)
	10 %	PEG 4000 (w/v)
	5 %	DMSO (v/v)
	50 mM	MgCl ₂

Alternativ wurden elektrisch kompetente Zellen nach einem Protokoll der Firma BioRad hergestellt. Analog oben, wurde eine 1:100 verdünnte ÜN-Kultur bei OD₆₀₀ 0.5-1 für 30 min auf Eis inkubiert, bei 3000 x g 4°C geerntet. Der Niederschlag wurde zunächst mit 300 ml, dann mit 150 ml kaltem, sterilen Wasser gewaschen. Der Resuspension in 6 ml kaltem 10 %igen Glycerin folgte die Aufnahme in 1 ml des Glycerols. Aliquots á 40 oder 80 µl wurden auf Trockeneis eingefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert.

5.2.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte zumeist auf chemischem Weg. Hierzu wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen aufgetaut, vorsichtig mit der DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschritt für 45 sec bei 42°C im Wasserbad wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Positive Transformanden wurden durch Wachstum auf LB-Amp- oder LB-Kan-Platten selektioniert.

Aus Hefe isolierte Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli* gebracht. 40 µl auf Eis aufgetaute elektrisch kompetente Zellen wurden mit Plasmid-DNA vermischt, für 5 min auf Eis inkubiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des Gene Pulsers der Firma Biorad bei 2.5 V, 200 Ω und 25 µFd. Nach dem Puls wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben, der Ansatz wie oben beschrieben für 1 h bei 37°C inkubiert und auf jeweiligen LB-Platten ausgespatelt.

SOC-Medium	2 %	Bacto Tryptone (w/v)
	0.5 %	Yeast Extract (w/v)
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose

5.2.4 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

100 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmischen Hefekultur (OD₆₀₀ 1-2) wurden geerntet, mit 10 ml TE pH 8.0 gewaschen und in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen. In einem Fiolaxglas,

METHODEN

0.75 g Glasperlen vorgelegt, erfolgte der Aufschluss für 1 min bei 4°C in einem Reagenzglas-schüttler. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen, die Glasperlen mit 200 µl Aufschlusspuffer nachgewaschen und beide Überstände vereinigt. Nach 4maliger Extraktion mit 1 Vol. Chloropan und 1 x mit 1 Vol. CIA wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc sowie 2.5 Vol. 98 % EtOH für 20 min auf Eis gefällt. Der mit 500 µl 70 % EtOH gewaschene Niederschlag konnte nach 10 min Trocknen in der Speed-Vac in 30 µl TE/RNase (75 µg/ml) aufgenommen werden.

Aufschlusspuffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0 100 mM NaCl 1 mM Na-EDTA 0.1 % SDS	Chloropan	0.05 %	Phenol:Chloroform 1:1 (v/v) p-Hydroxychinolin (w/v) äquilibriert mit ANE-Puffer
ANE-Puffer	10 mM Na-Aacetat 100 mM NaCl 1 mM Na-EDTA	CIA		Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (v/v)
		TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM Na-EDTA	

Alternativ erfolgte die Isolierung nach Robzyk und Kassir (1992). Eine Hefekultur wurde bis zur Sättigung in Selektivmedium angezogen. Der von 1.5 ml geernteter Kultur erhaltene Niederschlag wurde in 100 µl STET Puffer aufgenommen, die Zellen nach Zugabe von 0.2 g Glasperlen (\varnothing 0.4-0.6 mm) 3-mal 20 sec im Ribolyzer aufgeschlossen und erneut 100 µl STET Puffer zugegeben. Nach Erhitzen für 3 min bei 95°C wurde der Ansatz kurz abgekühlt, dann 10 min bei 16 000 x g und 4°C abzentrifugiert. Zur Proteinfällung wurden 100 µl des Überstandes, mit 50 µl 7.5 M NH₄Ac versehen, für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert und 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend konnte die DNA aus 100 µl des gereinigten Überstandes durch Zugabe von 200 µl kaltem 98 % EtOH und nachfolgender Zentrifugation gewonnen werden. Sie wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und, aufgenommen in 20 µl sterilem ddH₂O, für Retransformation von *E. coli* verwendet.

STET-Puffer	8 % Saccharose (w/v) 50 mM Tris-HCl pH 8.0 50 mM Na-EDTA 5 % Triton X-100 (v/v)
--------------------	--

5.2.5 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Methode basiert auf einem modifizierten Protokoll von Hoffmann und Winston (1987). 80 OD₆₀₀ Einheiten einer stationären Kultur wurden geerntet und mit 0.5 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen, mit 200 µl Phenol/

METHODEN

CHCl₃/ Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v) sowie 0.3 g Glasperlen (\varnothing 0.4-0.6 mm) versehen und durch 4-minütiges Vortexen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 μ l TE pH 8.0 wurden durch Zentrifugation die Phasen getrennt, die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, mit 1 ml 98 % EtOH gefällt, getrocknet und mit 400 μ l TE/RNase (75 μ g/ml) versehen. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 10 μ l 4 M NH₄Ac und 1 ml 98 % EtOH zugegeben und die genomische DNA für eine halbe Stunde auf Eis gefällt. Nach Waschen mit 70 % EtOH wurde der Niederschlag in der SpeedVac getrocknet und in 50 μ l TE pH 8.0 aufgenommen.

Die so erhaltene DNA wurde zum einen zur Amplifikation von Genen via PCR verwendet, zum anderen konnte auf die positive Integration von Epitopen getestet werden.

Aufschlusspuffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0	TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0
	100 mM NaCl		1 mM Na-EDTA
	1 mM Na-EDTA		
	1 % SDS (w/v)		
	2 % Triton X-100 (v/v)		

5.2.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe mit DNA erfolgte nach Schiestl und Gietz (1989). Pro Transformation wurden 10 OD₆₀₀ Zellen einer logarithmischen Hefekultur (OD₆₀₀ ~1) geerntet, zuerst mit sterilem ddH₂O, dann mit 1 ml 0.1 M TE/LiAc pH 8.0 gewaschen, anschließend in 50 μ l 0.1 M TE/LiAc pH 8.0 resuspendiert. Nach Zugabe von Plasmid-DNA (0.5-2 μ g) bzw. PCR-Produkt (1-10 μ g), 5 μ l Lachssperm-DNA (~50 μ g) sowie 300 μ l 40 % PEG4000 (w/v)/0.1 M TE/LiAc pH 8.0 wurde für 30 min bei 30°C, dann für 15 min bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Selektion erfolgte für Plasmide auf Platten mit Selektivmedium. Im Falle der Selektion auf Kanamycin bzw. G418 erfolgte ein Zwischenschritt, 3-4 h Schütteln bei 25°C, zur Expression des Resistenzgens.

TE/LiAc	0.1 M LiAc gelöst in TE pH 8.0	TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM Na-EDTA
----------------	-----------------------------------	-----------	---------------------------------------

5.2.7 PCR-Amplifikationen

Sämtliche Gene wurden mit der *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* von Finnzymes amplifiziert. Eine Ausnahme stellt die erste Amplifikation des Gens *PGLB* aus *C. jejuni* dar: hier wurde die *Taq DNA Polymerase* von Qiagen verwendet. Bei beiden Enzymen wurden die PCR-Reaktionen nach den Angaben des Herstellers angesetzt.

5.2.8 Subklonierung in den Vektor pUC19 oder pBS

Sämtliche über PCR amplifizierte Fragmente, sofern nicht anders angegeben, wurden vor der direkten Klonierung in den Vektor pBS (Stratagene) oder pUC19 (NEB) subkloniert. Ein Ansatz enthielt 25 ng Vektor, 0.25 pmol PCR-Produkt, 200 U T4 DNA Ligase (NEB) und 10 U *EcoRV* (NEB) bei pBS-, 10 U *SmaI* bei pUC-Klonierungen. Zusätzlich war 1 x Ligasepuffer und nur für pBS 100 mM NaCl enthalten. Dieses Gemisch wurde für 4-5 h bei 22°C inkubiert, die Enzyme durch 15 min bei 65°C inaktiviert und noch verbliebener, ungeschnittener leerer Vektor mittels Nachverdau mit 10 U *EcoRV* bzw. *SmaI* für 30 min bei 37 bzw. 25°C linearisiert. Anschließend wurde der ganze Ansatz in *E. coli* transformiert und auf Platten mit 0.004 % X-Gal (w/v) sowie 0.04 M IPTG ausplattiert. Durch *Blue-White-Screening* konnten selektiv nur weiße, positive Kolonien gepickt und nachfolgend über Restriktionsverdau analysiert werden.

Alternativ erfolgte die Subklonierung in den Vektor pCR®-BluntII-TOPO® mit Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) oder in den Vektor pDrive des QIAGEN® PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen), jeweils nach Angaben des Herstellers.

5.2.9 Klonierungen sowie Restriktionsanalysen

Anleitungen zur Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen, alkalischer Phosphatasen, Quick Ligase, T4 DNA Ligase sowie zur Herstellung analytischer und präparativer Agarosegelen wurden der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989) bzw. der jeweiligen Anweisung des Herstellers entnommen und ebenso durchgeführt. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte je nach Größe der Fragmente mit Hilfe des *MinElute™ Gel Extraction Kit* (Qiagen), *GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham) oder *peqGOLD Gel Extraction Kit* (PeqLab). Über Abgleich mit den Banden der Standards *EcoRI/HindIII* verdaute λ DNA oder *100 bp ladder plus* (beide Fermentas) wurde sowohl die Größe als auch die Menge von DNA-Stücken bestimmt.

5.2.10 Site-directed Mutagenese

Um gezielte Mutationen in gewünschte Gene einzuführen, wurde der *Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* oder der *Quick Change® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* mit einer Pfu Turbo Polymerase von Stratagene verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des

METHODEN

Herstellers. Das Prinzip beruht darauf, dass in der PCR Oligonukleotide benutzt werden, welche die Mutationen bereits enthalten. Zusammen mit Plasmiden als *template*, die das zu mutierende Gen tragen, werden ganze Plasmidstränge mit Basenpaaraustausch oder auch Insertion amplifiziert. Eine nachfolgende Inkubation mit *DpnI* sichert den Verdau aller unmutierten, methylierten Ausgangsplasmide. Nach Transformation in *E. coli* wird der komplementäre, mutierte Strang synthetisiert, folgend nur das mutierte Plasmid repliziert. Erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung des betreffenden Gens überprüft.

5.2.11 Genomische Epitopmarkierung von Proteinen aus *S. cerevisiae*

Um genomisch codierte Proteine mit einem C-terminalen Epitop zu markieren, wurde das Protein A(ZZ)-Epitop mit KanMX-Marker von dem Plasmid pZZ-Kan über PCR amplifiziert. Die *Primer* wurden so gewählt, dass sie ca. 50 bp komplementär zum gewünschten Gen und ca. 20 bp komplementär zum Plasmid sind. Über PCR generiert man somit ein lineares Genstück, welches am 5'-Ende komplementär zum Genende ist, jedoch ohne Stopp-Codon, im Mittelstück 2 x das Protein A-Epitop sowie das KanMX-Gen codiert, und am 3'-Ende erneut eine zum Gen komplementäre Sequenz enthält, welche sich ca. 50 bp nach dem Stopp-Codon im ORF befindet. Nach Transformation der Hefe erfolgt über diese beiden komplementären Enden homologe Rekombination ins Genom. Durch Ausplattieren auf Platten mit G418 wurde auf Integration des linearen PCR-Produkts selektiert. Des Weiteren wurde genomische DNA der wachstumspositiven Stämme benutzt, um über PCR mit Oligonukleotiden, welche sowohl im Gen als auch im Protein A-Epitop binden, eine Rekombination an der richtigen Stelle zu verifizieren. Einen letzten, endgültigen Nachweis lieferte jedoch nur die Analyse auf Expressionsebene über *Western Blot* bei Dekoration mit einem epitopspezifischen Antikörper.

5.2.12 Sequenzanalysen

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma GENEART GmbH (Regensburg). Von gereinigter DNA wurden ca. 240 ng, vom gewünschten Oligonukleotid 1 µl einer 10 µM Verdünnung in 8 µl Endvolumen je Sequenzanalyse abgegeben.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Isolierung von Rohmembranen

Die Präparation von Rohmembranen aus **Hefe** erfolgte nach einem Protokoll von Lehle und Tanner (1974) mittels Glasperlenaufschluss in einem Zellhomogenisator und anschließender differentieller Zentrifugation.

Maximal 8000 OD₆₀₀ Zellen einer stationären Kultur wurden für 10 min bei 4.000 x g, 4°C geerntet, mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 gewaschen und in äquivalenter Menge Aufschlusspuffer (ml)/Nassgewicht (g) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Pyrex-Glas (Firma Braun, Melsungen) überführt und 5 g Glasperlen (Ø 0.4-0.6 mm)/g Nassgewicht zugegeben. Der Aufschluß erfolgte in einem Zellhomogenisator der Firma Braun für 3 min bei max. Drehzahl unter CO₂-Kühlung und wurde hiernach mikroskopisch auf Erfolg untersucht. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mitsamt den Glasperlen über einem Büchnertrichter abgesaugt, das Gefäß sowie die Perlen mit 2 x 5 ml Aufschlusspuffer nachgewaschen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zellwandtrümmer wurden bei 500 x g, 4°C für 5 min abzentrifugiert, die Membranen selbst wurden durch 30 min Zentrifugation bei 48.000 x g pelletiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und separat bei -20°C bis zu eventueller Analyse verwahrt. Die Membranen wurden mit 5 ml Aufschlusspuffer gewaschen, in Membranaufnahmepuffer (4 OD₆₀₀ Einheiten/ µl Membranaufnahmepuffer) resuspendiert und mit Hilfe eines Glaspotters der Firma Braun homogenisiert.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Rohmembranen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Aufschlusspuffer	50 mM	Tris-HCl pH8.0	Membranaufnahmepuffer	30 mM	Tris-HCl pH 8.0
	1 mM	EtSH		3 mM	MgCl ₂
	1 mM	BA		1 mM	DTT
	1 mM	PMSF		35 %	Glycerin (v/v)
	1 mM	MgCl ₂			
	5 %	Glycerin (v/v)			

Die Isolierung im Kleinmaßstab aus **Hefe** erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll. 30 OD₆₀₀ Einheiten einer stationären Kultur wurden geerntet, mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 gewaschen und in 300 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein mit 0.8 g Glasperlen bestücktes Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 3 x 20 sec im "Fast Prep" auf-

METHODEN

geschlossen. Nach Durchstechen des Gefäßes mit einer heißen Kanüle wurde die Suspension für 5 sec bei 1.000 x g in ein frisches Tube zentrifugiert, anschließend analog der großen Präparation durch 3 min bei 500 x g, 4°C von Zelltrümmern befreit. Die Membranen wurden durch 30 min Zentrifugation bei 48.000 x g, 4°C erhalten und mittels eines Potters zu 5 OD/10 µl Membranaufnahmepuffer homogenisiert.

Aufschlusspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 1 mM EtSH 1 mM BA 1 mM PMSF	Membranaufnahmepuffer s. oben
-------------------------	--	--------------------------------------

Um Membranen und Cytosol des Stammes YG157 im Stt3-reprimierten Zustand zu isolieren, wurde eine Vorkultur in Medium mit Galaktose bei 30°C auf OD₆₀₀ 1-2 angezogen. Hiervon wurden so viele Zellen geerntet, um 30 ml Medium mit Glukose auf die Ausgangs-OD₆₀₀ von 0.05 anzuimpfen. Nach Ernte wurden die Zellen mit Glukosemedium gewaschen und eine definierte Menge in selbigem angeimpft. Die Inkubation erfolgte für mindestens 8 h bei 30°C, bis die optische Dichte in zwischen 1-2.5 betrug.

Die Isolierung von Rohmembranen aus *E. coli* erfolgte mittels eines *French Press* Aufschlusses mit anschließender differentieller Zentrifugation. 3000 OD₆₀₀-Einheiten einer induzierten Kultur wurden geerntet und 1 x mit 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.5 gewaschen. Die Zellen wurden in 4 ml kaltem Aufschlusspuffer aufgenommen und in einer vorgekühlten kleinen *French Press* Zelle 1 x bei max. Druck aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 6.000 x g wurde der Überstand ohne Zelltrümmer abgenommen und die Membranen bei 48.000 x g, 4°C für 30 min abzentrifugiert. Mit Hilfe eines Potters wurden die Membranen schließlich in Membranaufnahmepuffer (s. oben) homogenisiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Aliquots bei -80°C gelagert.

Aufschlusspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM BA 1 mM PMSF
-------------------------	---

5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Hierbei wurde anhand einer mit 2-25 µg BSA erstellten Eichkurve die Proteinkonzentration ermittelt. Die in X.3.1 isolierten Rohmembranen wurden 1:20 verdünnt, davon 5-30 µl in den

METHODEN

Test eingesetzt. Die Aliquots wurden auf 1 ml ddH₂O aufgefüllt, mit 1 ml Coomassie® Plus Protein Assay Reagent der Firma Pierce bzw. Coo Protein Assay Reagent der Firma Interchim gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert (reines ddH₂O) gemessen.

5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden nach Laemmli und King (1970) über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde die Apparatur *Protean Cell III* der Firma BioRad benutzt.

SDS-Laupuffer	25 mM 192 mM 0.1 %	Tris-Base Glycin SDS (w/v)	1-fach SDS-Probenpuffer	62.5 mM 2 % 5 % 0.15 M 0.5 %	Tris-HCl pH6.8 SDS (w/v) Glycerin (v/v) EtSH Bromphenolblau (w/v)
6-fach SDS-Probenpuffer	250 mM 12 % 20 % 2.8 M 0.6 %	Tris-HCl pH 6.8 SDS (w/v) Glycerin (v/v) EtSH Bromphenolblau (w/v)			

Zur Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie, wurden die Gele mindestens 2 h in Färbelösung geschwenkt, eine Entfärbung erfolgte meist durch Inkubation ÜN mit Entfärbler.

Färbelösung	0.035 % 0.25 % 0.1 %	Serva-Blue G (w/v) Isopropanol (v/v) Essigsäure (v/v)	Entfärbelösung	0.1 % 0.1 %	Isopropanol (v/v) Essigsäure (v/v)
--------------------	----------------------------	---	-----------------------	----------------	---------------------------------------

5.3.4 Western Blot Analyse

Nach Auf trennung der Proteine über SDS-PAGE, wurden diese mittels einer *Protean Cell III* (BioRad) im *Wet-Blot* Verfahren auf Nitrocellulose transferiert. Hierzu wurden Nitrocellulose BA-S 85 (Schleicher & Schuell), Whatmanpapier 3 mm und Schwämme für mindestens 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des *Blots* wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 360 mA und max. 150V für 30 min.

Anschließend wurden die Proteinbanden durch Behandlung mit Ponceau S-Lösung (Fluka) sichtbar gemacht, nach Anzeichnen der Spuren sowie des Molekulargewichtsstandards (BioRad oder PeqLab) in Wasser wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde der *Blot* für 1 h in TBST & 5 % Magermilchpulver (w/v) geschwenkt, dann 2 x 10 min mit TBS gewaschen. Die Antikörperdekoration erfolgte für jeweils 1 h, wobei zwischen und

METHODEN

nach den Inkubationen je 1 x mit TBST & 1 % Magermilchpulver (w/v) und 2 x mit TBS à 10 min gewaschen wurde.

Transferpuffer	20 mM	Tris-Base	TBST	50 mM	Tris-HCl pH 7.5
	150 mM	Glycin		150 mM	NaCl
	20 %	MeOH (v/v)		0.2 %	Tween 20 (v/v)
	0.02 %	SDS	TBS	50 mM	Tris-HCl pH 7.5
				150 mM	NaCl

Antigen-Antikörper-HRP Komplexe wurden mit Hilfe des *ECL* und *ECLPlusWestern Blotting Detection System* (Amersham) bzw des *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrates* (Pierce) nach Angaben des jeweiligen Herstellers detektiert.

Um einen *Blot* nachfolgend mit anderen Antikörpern zu dekorieren, wurde die Membran einem sogenannten *Western Stripping* unterzogen. Durch 30 min Inkubation bei 50°C in *Strippingpuffer* konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe wieder entfernt werden. Nach 3 x Waschen mit TBS war eine Neudekoration, wie oben beschrieben, erneut möglich.

Strippingpuffer	62.5 mM	Tris-HCl pH 6.7
	2 %	SDS
	100 mM	MeSH

5.3.5 Blue Native Analyse

Die Analyse von nativen Proteinen bzw. Proteinkomplexen erfolgte mit Hilfe der *Blue Native Polyacrylamide Gel Elektrophoresis* (BN PAGE) nach der Methode von Schägger und Jagow (1991). Hierfür stammten alle Materialien von der Firma Invitrogen: *XCell SureLock™ Mini-Cell*, *XCell II™ Blot Module*, *NativePAGE™ Novex® 4-16% Bis-Tris Gel*, *NativePAGE™ Sample Prep Kit*, *NativeMark™ Unstained Protein Standard*, *NativePAGE™ Running Buffer Kit*, *NuPAGE® Transfer Buffer*. Das Prinzip beruht darauf, dass solubilisierte Proteinkomplexe unter nativen, d.h. weder denaturierenden noch reduzierenden Bedingungen, in einem Bis-Tris Gel aufgetrennt werden. Zur Solubilisierung benutzt man milde, nicht-ionische Detergentien wie Digitonin, um die Tertiärstruktur der Polypeptide so gut wie möglich unangetastet zu lassen. Die Auf trennung der Proteine erfolgt in einem Gradientengel, so dass Komplexe bei ihrer nativen Größe zum Liegen kommen. Als negativer Ladungsträger wird Coomassie G-250 eingesetzt, das an hydrophobe Bereiche bindet ohne das Protein zu denaturieren und zusätzlich vor Aggregation schützt.

Solubilisierung: Für einen Ansatz von 56 µl wurden 270 µg Rohmembranen (12 mg/ml) in einem Beckman Zentrifugenröhrlchen auf Eis vorgelegt. Unter langsamem Vortexen wurden

METHODEN

33.5 µl eines Prämixes aus 1.64 % Digitonin (Endkonzentration 1 %) sowie 1 x *Native PAGE™ Sample Buffer* zugegeben und für 20 min auf Eis solubilisiert. Durch Zentrifugation bei 150.000 x g für 40 min (2°C) konnte das Solubilisat von der überbleibenden Membranfraktion getrennt werden.

Probenauftrag: Vom *NativeMark™ Unstained Protein Standard* wurden je Spur 5 µl aufgetragen. Vom Solubilisat wurden 5 µl mit 1/20 Vol. *NativePAGE™ 5 % G-250 Sample Additive* Coomassie G-250 (Endkonzentration 0.25 %) versetzt, was ¼ der Detergenskonzentration entspricht. Sollte die Probe denaturiert aufgetragen werden, wurde das Solubilisat vor Zugeabe des Coomassie mit 1 % SDS (w/v) für 15 min bei 45°C erhitzt.

Gellauf: Die Puffer wurden nach den Angaben des Herstellers verdünnt bzw. gemischt. Der Lauf wurde bei 150 V in der Kühlkammer gestartet. Nach ca. 45 min (1/3 des Gellaufs) wurde der innere Kammerpuffer mit 0.02 % Coomassie G-250 ausgetauscht gegen Puffer mit 0.002 %. Nach 15 min wurde die Spannung auf 250 V erhöht. Insgesamte Elektrophoresedauer 110-120 min.

Blotting: Dieser Vorgang erfolgte nach Angaben des Herstellers. Geblottet wurde ebenfalls in der Kühlkammer für 1 h bei 30 V.

Zur Proteinfixierung wurde die Membran für 15 min in 8 % HAc inkubiert, mit ddH₂O gespült und anschließend getrocknet. Um überschüssiges Coomassie abzuwaschen, wurde die Membran solange in 100 % MeOH eingelegt, bis kein G-250 mehr in Lösung ging. Nach Anzeichen des Standards und der übrigen Spuren, wurde mit dem Blockieren und Dekorieren fortgefahren wie unter 5.3.4 beschrieben.

5.3.6 Metabolische Markierung der CPY aus *S. cerevisiae* mit ³⁵S-Methionin/Cystein

Eine Hefekultur wurde in Selektivmedium bei 30°C bzw. 25°C für temperatursensitive Stämme bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen. 15 OD₆₀₀ Einheiten wurden geerntet, 1 x mit 5 ml Minimalmedium gewaschen und in 5 ml Minimalmedium mit entsprechenden Aminosäuren aufgenommen. Je nach Kultur, wurden t_s-Stämme zur Ausprägung eines stärkeren Phänotyps für 30 min bei 36°C vorinkubiert, bei nichtsensitiven Hefen betrug die Temperatur 30°C. Zur Markierung wurden 75 µCi ³⁵S-Methionin/Cystein (spez. Aktivität 10 µCi/µl) zugegeben und 45 min bei 36°C weitergeschüttelt. Hiernach wurden die Hefen abzentrifugiert und 1 x mit 5 ml 10 mM Na-Azid gewaschen. Die Zellen, aufgenommen in 300 µl Aufschlusspuffer, wurden durch Zugabe von 1.2 g Glasperlen (Ø 0.4-0.6 mm) in Fiolaxgläsern für 10 min bei 4°C auf einem Reagenzglasschüttler aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit einer ausgezogenen

METHODEN

Pasteurpipette abgenommen, die Glasperlen 1 x mit 200 µl Aufschlusspuffer nachgewaschen und die vereinigten Überstände für 30 min bei 4°C und 48.000 x g zentrifugiert. Die so von Membranproteinen und Zellwandfragmenten separierten löslichen Polypeptide wurden abgehoben und mit 1 % (w/v) SDS für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung wurde 1 ml TNET-Puffer sowie 5 µl anti-CPY Antikörper zugegeben, die markierte Carboxypeptidase ÜN bei 4°C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde zur Entfernung unspezifischer Aggregate für 30 min bei 4°C und 48.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 5 mg Protein A-Sepharose (Amersham) gegeben, welche für 30 min in 1 ml TNET-Puffer gequollen war. Zur Präzipitierung von Antigen-Antikörper-Komplexen wurde der Ansatz für mindestens 2 h *end over end* bei 4°C gerollert, anschließend 4 x mit je 1 ml TNET-Puffer und 1 x mit 1 ml Tris Saline gewaschen. Um das Präzipitat von der Sepharose abzulösen, wurde der Ansatz 2 x mit je 35 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht und die jeweiligen Überstände vereinigt. Die Auf trennung des Proteingemisches erfolgte auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel. Nach Anfärbung der Proteinbanden sowie des Molekulargewichtsstandards (BioRad oder PeqLab) wurde die SDS-PAGE zur Verstärkung der Autoradiographie für 30 min in *Amplify*-Lösung der Firma Amersham geschwenkt und anschließend getrocknet. Zur Sichtbarmachung der markierten CPY wurde ein BioMaxTMMR Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt und für 1-6 Tage bei -80°C exponiert.

Sollte die CPY im Stamm YG157 nach Repression von *Stt3* radioaktiv verfolgt werden, wurde zunächst eine Vorkultur in Selektivmedium mit Galaktose bis zu einer OD₆₀₀ 1-2 angezogen. Davon wurden so viele Zellen geerntet und 1 x mit YNB-*drop-out* plus Glukose gewaschen, um 25 ml desselben Mediums auf OD₆₀₀ 0.05 anzuimpfen. Diese Kultur wurde für 8 h bei 30°C inkubiert, währenddessen das genomische *STT3* bei Coexpression der plasmidkodierten Homologe oder Fusionen abgeschaltet wurde. Nach diesem Zwischenschritt lag die OD₆₀₀ der Hefen bei 1-3, wovon 15 OD₆₀₀ Einheiten geerntet und nachfolgend analog dem Protokoll für nicht temperatursensiti-ve Stämme inkubiert bzw. markiert wurden.

Aufschlusspuffer	50 mM	Tris-HCl pH 7.5	TNET-Puffer	50 mM	Tris-HCl pH 7.4
	1 mM	EtSH		3 mM	Na-EDTA
	1 mM	BA		150 mM	NaCl
	1 mM	PMSF		1.25 %	Triton X-100 (v/v)
Tris-Saline	50 mM	Tris-HCl pH 7.5			
	100 mM	NaCl			

METHODEN

5.3.7 *In vitro* Transkription und Translation im Reticulocyten Lysat

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde mit Hilfe des *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems* von Promega durchgeführt. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht darauf, dass in einem Reaktionsgefäß Transkription und Translation erfolgen. Ein Ansatz enthält neben der für mRNA-Bildung nötigen Polymerase ein Reticulocyten Lysat aus Hase mit sämtlichen Komponenten zur Proteinsynthese. Als *template* dienten die entsprechenden, in den Vektor pTNT™ (Promega) klonierten Gene, welcher sowohl den SP6- als auch den T7-Promotor enthält. Sollte die Biosynthese radioaktiv verfolgt werden, wurden zusätzlich je 50 µl Ansatz 30 µCi ³⁵S-Methionin/Cystein eingesetzt. Zur Verhinderung von mRNA-Degradation wurden zudem 42 U/ 50 µl des *RNAguard™ RNase Inhibitors* (Amersham) zugegeben. Ebenfalls wurde nur nukleasefreies Wasser verwendet, in welchem auch die Plasmide aufgenommen wurden.

5.3.8 Bestimmung der N-Oligosaccharyltransferase-Aktivität

Die Messung der *in vitro* Aktivität erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Sharma *et al.* (1981) sowie Zufferey *et al.* (1995). Hierbei wurden als Glykosyldonoren DolPP-GlcNAc₂-[³H]-Man₉Glc₃, DolPP-GlcNAc₂-[³H]-Man₉, DolPP-GlcNAc₂-[³H]-Man₆, DolPP-GlcNAc₂-[³H]-Man₅ oder DolPP-[¹⁴C]-GlcNAc₂ eingesetzt, welche durch *in vivo*-Markierung bestimmter *Δalg*-Stämme erhalten wurden. Als N-Glycosylakzeptor dienten verschiedene synthetische Akzeptorpeptide, wie in den einzelnen Experimenten jeweils angegeben ist.

Ein Reaktionsansatz von 60 µl enthielt		
	120 µg	Rohmembranen (12 mg/ml)
	0.9 %	Triton X-100 (v/v)
	8.0 mM	Tris-HCl pH 7.2-7.4
	7.9 mM	MnCl ₂
	5.5 %	DMSO
	2.5 mM	synthetisches Akzeptorpeptid
4000 cpm bzw.		Chitobiose DolPP-[¹⁴ C]-GlcNAc ₂
10.000 cpm		DolPP-GlcNAc ₂ -[³ H]-Man ₉ Glc ₃ , DolPP-GlcNAc ₂ -[³ H]-Man ₉ , DolPP-GlcNAc ₂ -[³ H]-Man ₆ oder DolPP-GlcNAc ₂ -[³ H]-Man ₅

Test mit Chitobiose DolPP-[¹⁴C]-GlcNAc₂: Der Ansatz wurde auf Eis in einem Fiolaxglas vorgelegt und durch Zugabe des Glykosyldonors gestartet. Die Inkubation erfolgte für 5-30 min (siehe jeweiliger Test) bei 24°C in einem Wasserbad und wurde mit 2 x 1ml C/M 3:2 (v/v) abgestoppt. Durch Zugabe von 340 µl ddH₂O wurde eine Folch-Verteilung erzielt, welche nach Durchmischung zur Phasentrennung 5 min bei 1.200 x g abzentrifugiert wurde. Die

METHODEN

obere, wässrige Phase, welches das gebildete Glykopeptid enthält, wurde vorsichtig abgenommen und bei 60°C getrocknet. Nach Resuspension in 400 µl ddH₂O und Zugabe von 5 ml Szintcocktail (Firma Roth) erfolgte die Auswertung im Szintillationszähler.

Test mit allen anderen Glykosyldonoren: Die Ansätze wurden analog für Chitobiose auf Eis in einem Fiolaxglas vorgelegt. Im Falle des Vollängenoligosaccharids DolPP-GlcNAc₂-[³H]-Man₉Glc₃ wurde dem Ansatz zudem 1.3 mM Desoxynojirimycin zugegeben. Dieser Hemmstoff der Glukosidase I verhindert eine Abspaltung der endständigen Glukose vom Glykosyldonor. Die Reaktionen wurden für 5-30 min bei 24°C in einem Wasserbad inkubiert und durch Zugabe von 2 x 900 µl C:M 2:1 (v/v) abgestoppt. Nach Zugabe von 600 µl ddH₂O und Durchmischen wurde für 10 min bei 1.200 x g zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden vorsichtig 600 µl abgenommen, die verbleibende Inter- sowie untere Phase 3 x mit je 600 µl synthetischer *upper phase* gewaschen, wobei jeweils wie zu Beginn 600 µl der oberen Phase nach dem Zentrifugieren abgenommen wurden. Die Überstände wurden vereinigt, bei 60°C getrocknet und analog der Reaktion mit Chitobiose in 400 µl ddH₂O und 5 ml Szintcocktail aufgenommen und im Szintillationszähler ausgewertet.

Synthetische upper phase: C/M/H (v/v/v) 0.992:32:48

5.3.9 Rekonstitution in PE-Vesikeln

Um den OST-Komplex bzw. einzelne Proteine in Vesikel zu rekonstituieren, erfolgte zunächst eine Solubilisierung mit Oktylglukosid. Mittels Dialyse konnten die gemischten Micellen vom Detergens befreit und gleichzeitig durch Phosphatidylethanolamin ersetzt werden, was die Bildung von PE-Vesikeln zur Folge hatte. Diese wurden in einen OST-Aktivitätstest eingesetzt (5.3.8). Um auf erfolgte Integration in die Vesikel zu prüfen, wurde ein *Western Blot* durchgeführt (5.3.4).

Solubilisierung: Im Standardprotokoll wurden 270 µg Rohmembranen (12 mg/ml) mit 0.5 M KCl und 1 % OG (w/v) in einem Ansatz von 50 µl Gesamtvolumen solubilisiert. Die Membranproteine wurden mit 16.25 µl Membranaufnahmepuffer (5.3.1) in einem Beckman Zentrifugenröhrchen auf Eis vorgelegt. Unter langsamem Vortexen wurden zunächst 6.25 µl 4 M KCl, dann 5 µl 10 % OG (w/v) zugegeben und für 20 min auf Eis solubilisiert. Nach Zentrifugation für 40 min bei 150.000 x g konnten die aus der Membran gelösten Proteine mit dem Überstand abgenommen werden. Für abweichende Ansätze wie etwa die Solubilisierung aus *E. coli* wurde neben Oktylglukosid der Zusatz von SDS benötigt. Die genauen Angaben sind hier dem jeweiligen Experiment direkt zu entnehmen.

METHODEN

PE-Aufreinigung: Bei dem verwendeten Phospholipid handelte es sich um aus *E. coli* gewonnenem, lyophilisiertem L- α -Phosphatidylethanolamin (Firma Sigma). Für die Aufreinigung wurden alle Gegenstände, soweit als möglich, aus Glas verwendet. 1 g des Phospholipids wurde in 5 ml Chloroform aufgenommen und in einen Erlenmeyerkolben mit Glasstopfen überführt. Zur Präzipitation wurden 150 ml kalter Aceton und 2 mM DTT zugegeben und für mindestens 3 h unter Stickstoffatmosphäre bei RT im Dunklen gerührt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3.000 x g wurde der Überstand verworfen, der Niederschlag mit Stickstoff getrocknet, anschließend in 200 ml Diethylether und 2 mM DTT resuspendiert und für 10-20 min gerührt. Der durch Zentrifugation gewonnene Überstand wurde in einen großen Rundkolben überführt und bei RT unter Vakuum einrotiert. Nach Zugabe von 2-5 ml Chloroform wurde das PE jetzt in einen kleinen Rundhalskolben überführt, erneut evaporiert und das so gewonnene, gereinigte Phospholipid gewogen. Mit einer gewöhnlichen Ausbeute von 88 % wurde das Ethanolamin in Chloroform auf eine Endkonzentration von 100 mg/ml aufgenommen und mit 1 mM DTT versetzt. Diese Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

PE-Präparation für die Dialyse: 20 mg des PE aus der Stammlösung wurden mit Stickstoff eingeblasen und anschließend weiter für 20 min in einer SpeedVac getrocknet. Zur Resuspension wurden 2 ml des Membranaufnahmepuffers (5.3.1) mit 1 % OG (w/v) zugegeben und zunächst versucht, das PE durch Vortexen in Lösung zu bringen. Falls dies nicht erfolgreich war, wurde die Suspension auf Eiswasser mit Hilfe eines Sonifiers beschallt. Das so präparierte PE (10 mg/ml) wurde bei -20°C gelagert.

Dialyse: Die Dialyse erfolgte mit einem Verhältnis 0.1 mg (solubilisiertes) Protein/2 mg PE. Hierzu wurden 2 mg PE in einem Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis vorgelegt und mit 100 µg Solubilisat versehen. Das Reaktionsgefäß wurde 2 x kräftig invertiert und das so vereinigte Gemisch in einen ca. 8 cm langen Dialysierschlauch (*Servapor Dialysis Tubing*, MWCO 12.000-14.000, *Pore Size* ~25 Å, Firma Serva) pipettiert, welcher zuvor für 1 min in ddH₂O mit einer Spatelspitze EDTA aufgekocht worden war. Nun wurde ÜN bei 4°C in 1 Liter Dialysepuffer unter langsamen Rühren dialysiert. Am folgenden Tag wurden die Proben aus dem Schlauch in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert, und die Lipidvesikel für 40 min bei 2°C und 150.000 x g zentrifugiert. Die Vesikel rekonstituierten Proteine wurden in Dialysepuffer auf 0.7 µg/µl aufgenommen und in dieser Form in den OST-Test eingesetzt bzw. über *Western Blot* analysiert.

Dialysepuffer 30 mM Tris-HCl pH 7.5
 1.5 mM MgCl₂

METHODEN

5.3.10 Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H)

Um den Glykosylierungsstatus von Proteinen zu untersuchen, wurde ein Verdau mit Endoglykosidase H mit anschließender *Western Blot* Analyse durchgeführt. Hierzu wurden ca. 200 µg Rohmembranen mit 0.5 % SDS (w/v) und 0.5 % EtSH (v/v) für 10 min bei 45°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurden die Proteine denaturiert, wodurch die Glykanketten besser für die Endo H zugänglich sind. Nach Zugabe von 4 Vol. 100 mM Na-Citrat-Puffer pH 5.0 und 0.5 % Oktylglukosid (w/v) wurde ein Teil der Suspension mit 2 µl Endo H (Eigenpräparation des Labors) für 4 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Aliquot ohne Enzym inkubiert. Die Analyse der Proteine erfolgte über *Western Blot*.

5.4 Wachstumstests von *S. cerevisiae*

5.4.1 Tüpfeltest

Die Hefezellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ ~1 angezogen. Im Falle des Stammes YG157 mit Galaktose induzierbaren Promotor erfolgte die Aufzucht in galaktosehaltigem Selektivmedium. Eine OD₆₀₀ Einheit wurde geerntet, 1 x mit Glukose-Medium gewaschen und in selbigem auf OD₆₀₀ 1 aufgenommen. Von 10⁷ Zellen/ml wurden 5 Verdünnungen (10⁻¹-10⁻⁵) in YNB-*drop-out*-Glukose hergestellt und jeweils 3 µl auf Vollmediumplatten mit Glukose oder Galaktose getüpfelt. Bei allen anderen Stämmen erfolgte die Aufzucht und weitere Behandlung analog, das Selektivmedium enthielt jedoch stets Glukose als Zuckerquelle, die Verdünnungen wurden ebenso nur auf Platten mit Glukose gebracht. Die Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen ist den einzelnen Tests direkt zu entnehmen.

5.4.2 Tetradenanalyse

Um den Einfluss von plasmidkodierten Proteinen auf das Wachstum von Stt3-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden die jeweiligen Plasmide in den diploiden Hefestamm *STT3/Δstt3* transformiert. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde diese dick auf einer Sporulationsplatte ausgestrichen und bei 25°C inkubiert. Nach ca. 4 Tagen waren ausreichend Zellen zu mikroskopisch sichtbaren Tetraden sporuliert. Um nun die Muttersporenzellwand anzudauen, wurden einige Tetraden mit Impföse von Platte abgenommen, in 50 µl einer 1:5 in Tetradenpuffer verdünnten 0.5 % (w/v) Zymolyase resuspendiert und mit selbigem Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Nach Inkubation für 10-20 min bei RT wurden die Zellen zentrifugiert und in ca.

METHODEN

150 µl Tetradenpuffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Impföse auf Vollmedium ausgestrichen, die einzelnen Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators separiert und nach ihrer Zugehörigkeit auf Voll- oder Selektivmedium abgelegt. Die gepickten Hefen wurden anschließend für ca. 2 Tage bei 25°C inkubiert.

Sporulationsplatten	1 %	K-Aacetat	Tetradenpuffer	1 M	Sorbit
	2 %	Agar-Agar hochrein		10 mM	Tris-HCl pH 7.5
Endkonzentration	5 mg/l	Histidin		2 mM	Na-EDTA
	7,5 mg/l	Leucin			
	7,5 mg/l	Lysin			
	5 mg/l	Methionin			

6. Literaturverzeichnis

Bause, E. (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. Biochem J 209, 331-336

Ben-Dor, S., Esterman, N., Rubin, E., Sharon, N. (2004). Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites. Glycobiology 14, 95-101

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ana Biochem 72, 248-254

Breuer, W., Bause, E. (1995). Oligosaccharyl transferase is a constitutive component of an oligomeric protein complex from pig liver endoplasmic reticulum. Eur J Biochem 228, 689-696

Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U., Parodi, A.J. (1988). Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: Protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa. J Biol Chem Vol. 263, No. 33, 17360-17365

Caramelo, J.J., Parodi, A.J. (2007). How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. Sem in Cell & Devel Biol 18, 732-742

Caspari, T., Robl, I., Stolz, J., Tanner, W. (1996). Purification of the *Chlorella* HUP1 hexose-proton symporter to homogeneity and its reconstitution *in vitro*. Plant J 10, 1045-1053

Castro, O., Movsichoff, F., Parodi, A.J. (2006). Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. Proc Natl Acad Sci Vol. 103, No. 40, 14756-14760

Chavan, M., Chen, Z., Li, G., Schindelin, H., Lennarz, W.J., Li, H. (2006). Dimeric organization of the yeast oligosaccharyl transferase complex. Proc Natl Acad Sci Vol. 103, No. 24, 8947-8952

Chavan, M., Yan, A., Lennarz, W.J. (2005). Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. J Biol Chem Vol. 280, Vol. 24, 22917-22924

Chen, M.M., Glover, K.J., Imperiali, B. (2007). From peptide to protein: Comparative analysis of the substrate specificity of N-linked glycosylation in *C. Jejuni*. Biochemistry Vol. 46, No. 18, 5579-5585

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. Gene Vol. 110, No. 1, 119-122

LITERATURVERZEICHNIS

Costigan, C., Gehrung, S., Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. Mol Cell Biol 12, 1162-1178

Dorrell, N., Mangan, J.A., Laing, K.G., Hinds, J., Linton, D., Al-Ghusein, H., Barrell, B.G., Parkhill, J., Stoker, N.J., Karlyshev, O.V., Butcher, P.D., Wren, B.W. (2001). Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. Genome Res 11, 1706-1715

Elorza, M.V., Hortensia, R., Sentandreu, R. (1993). Calcofluor White alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. J Gen Microbiol 129, 1577-1582

Feldman, M.F., Wacker, M., Hernandez, M., Hitchen, P.G., Marolda, C.L., Kowarik, M., Morris, H.R., Dell, A., Valvano, M.A., Aebi, M. (2005). Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. Vol. 102, No. 8, 3016-3021

Glover, K.J., Weerapana, E., Chen, M.M., Imperiali, B. (2006). Direct biochemical evidence for the utilization of UDP-bacillosamine by PglC, an essential glycosyl-1-phosphate transferase in the *Campylobacter jejuni* N-linked glycosylation pathway. Biochem 45, 5343-5350

Glover, K.J., Weerapana, E., Imperiali, B. (2005a). *In vitro* assembly of the undecaprenyl-pyrophosphate-linked heptasaccharide for prokaryotic N-linked glycosylation. Proc Natl Acad Sci Vol. 102, No. 40, 14255-14259

Glover, K.J., Weerapana, E., Numao, S., Imperiali, B. (2005b). Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides with PglB, a bacterial oligosaccharyl transferase from *Campylobacter jejuni*. Chem Biol Vol. 12, No. 12, 1311-1315

Gutiérrez, A., Sanchez-Lopez, R., Ramos, M.A., Alagon, A. (2000). Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 Gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. Arch Med Res 31, 162-164

Hammond, C., Braalman, L., Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. Proc Natl Acad Sci USA 91, 913-917

Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell Vol. 5, No. 3, 253-265

Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., Aebi, M. (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature Vol. 415, No. 6870, 447-450

Hese, K. (2003). Der Oligosaccharyltransferase-Komplex aus Hefe: Funktionelle Charakterisierung von STT3. Diplomarbeit.

Hoffmann, C. S., Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57, 267-272

LITERATURVERZEICHNIS

- Igura, M., Maita, N., Obita, T., Kamishikiryō, J., Maenaka, K., Kohda, D. (2007).** Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble domain of the oligosaccharyltransferase STT3 subunit from the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 798-801
- Jaeken, J., Carchon, H. (2001).** Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Curr Opin Neurol* 14, 811-815
- Jungmann, J., Munro, S. (1998).** Multi-protein complexes in the cis golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J* Vol. 17, No. 2, 423-434
- Karamyshev, A.L., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Johnson, A.E., von Heijne, G., Nilsson I. (2005).** Mapping the interaction of the STT3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex with nascent polypeptide chains. *J Biol Chem* Vol. 280, No. 49, 40489-40493
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R. (1997).** The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem* Vol. 272, No. 51, 32513-32520
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R. (2001).** Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase. *Biochemistry* 40, 12193-12206
- Karlyshev, A.V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D.G., Wren, B.W. (2004).** The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* Vol. 150, No. 6, 1957-1964
- Kelleher, D.J., Banerjee, S., Cura, A.J., Samuelson, J., Gilmore, R. (2007).** Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. *J Cell Biol* Vol. 177, No. 1, 29-37
- Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C., Gilmore, R. (2003).** Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol Cell* 12, 101-111
- Kelleher, D.J., Kreibich, G., Gilmore, R. (1992).** Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell* 69, 55-65
- Kim, H., von Heijne, G., Nilsson, I. (2005).** Membrane topology of the Stt3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex. *J Biol Chem* Vol. 280, No. 21, 20261-20267
- Knauer, R., Lehle, L. (1994).** The N-Oligosaccharyltransferase complex from yeast. *FEBS Lett* 344, 83-86
- Knauer, R., Lehle, L. (1999a).** The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta* Vol. 1426, No. 2, 259-273
- Knauer, R., Lehle, L. (1999b).** The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the *OST6* gene, its synthetic interaction with *OST3*, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* Vol. 274, No. 24, 17249-17256

LITERATURVERZEICHNIS

Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664

Kowarik, M., Numao, S., Feldman, M.F., Schulz, B.L., Callewaert, N., Kiermaier, E., Catrain, I., Aebi, M. (2006a). N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science* Vol. 314, No. 5802, 1148-1150

Kowarik, M., Young, N.M., Numao, S., Schulz, B.L., Hug, I., Callewaert, N., Mills, D.C., Watson, D.C., Hernandez, M., Kelly, J.F., Wacker, M., Aebi, M. (2006b). Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J.* 25, 1957-1966

Kumar, V., Heinemann, S., Ozols, J. (1994). Purification and characterization of avian oligosaccharyltransferase. *J Biol Chem* 269, 13451-13457

Laemmli, U. K., King, J. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Larsen, J.C., Szymanski, C., Guerry, P. (2004). N-linked protein glycosylation is required for full competence in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol* Vol. 186, No. 19, 6508-6514

Lechner, J., Wieland, F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 58, 173-194

Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 6802-6818

Lehle, L., Tanner, W. (1995). Protein glycosylation in yeast. In Montreuil, J., Schachter, H., Vliegenhart, J.F.G. (Hrsg.). *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam, Niederlande 29a, 475-509

Levin, D.E., Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* 116, 1221-1229

Li, G., Yan, Q., Nita-Lazar, A., Haltiwanger, S., Lennarz, W.J. (2005). Studies on the N-glycosylation of the subunits of oligosaccharyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* Vol. 280, No. 3, 1864-1871

Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A.V., Cronshaw, A.D., Wren, B.W. (2002). Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* Vol. 43, No. 2, 497-508

Lissy, N.A., Bellacosa, A., Sonoda, G., Miller, P.D., Jhanwar, S.C., Testa, J.R. (1996). Isolation, characterization, and mapping to human chromosome 11q24-25 of a cDNA encoding a highly conserved putative transmembrane protein, TMC. *Biochim Biophys Acta* 1306, 137-141

Mellquist, J.L., Kasturi, L., Spitalnik, S.L., Shakin-Eshleman, S.H. (1998). The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* Vol. 37, No. 19, 6833-6837

LITERATURVERZEICHNIS

- Nilsson, I., Kelleher, D.J., Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., von Heijne, G., Johnson, A.E. (2003).** Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J Biol Chem* Vol. 161, No. 4, 715-725
- Nilsson, I., von Heijne, G. (1993).** Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 268, 5798-5801
- Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S., Aebi, M. (2005).** The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* Vol. 15, No. 4, 361-367
- Opekarová, M., Robl, I., Graßl, R., Tanner, W. (1999).** Expression of eukaryotic plasma membrane transporter HUP1 from *Chlorella kessleri* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 174, 65-72
- Parodi, A.J. (1993).** N-glycosylation in trypanosomatid protozoa (mini review). *Glycobiology* Vol. 3, No. 3, 193-199
- Parodi, A.J., Cazzulo, J.J. (1982a).** Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. II Partial characterization of protein-bound oligosaccharides labeled “*in vivo*”. *J Biol Chem* 257, 7641-7645
- Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z., Mendelzon, D.H. (1983).** Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharides. *J Biol Chem* 258, 5589-5595
- Parodi, A.J., Quesada-Allué, L.A. (1982b).** Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. I Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized *in vivo*. *J Biol Chem* 257, 7637-7640
- Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A., Wormald, M.R. (2004).** Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiol* Vol. 14, No. 2, 103-114
- Rangarajan, E.S., Bhatia, S., Watson, D.C., Munger, C., Cygler, M., Matte, A., Young, N.M. (2007).** Structural context for protein N-glycosylation in bacteria: The structure of PEB3, an adhesin from *Campylobacter jejuni*. *Protein Sci* 16, 990-995
- Robzyk, K., Kassir, Y. (1992).** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acid Res* Vol. 20, No. 14, 3790
- Roitsch, T., Lehle, L. (1989).** Structural requirements for protein N-glycosylation. Influence of acceptor peptides on cotranslational glycosylation of yeast invertase and site-directed mutagenesis around a sequon sequence. *Eur J Biochem* 181, 525-529
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY
- Sauer, N., Stolz, J (1994).** SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 6, 67-77

LITERATURVERZEICHNIS

- Schägger, H., von Jagow, G. (1991).** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231
- Schiestl, R. H., Gietz, R. D. (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346
- Schwarz, M., Knauer, R., Lehle, L. (2005).** Yeast oligosaccharyltransferase consists of two functionally distinct sub-complexes, specified by either the Ost3p or Ost6p. *FEBS Lett* 579, 6564-6568
- Shams-Eldin, H., Blaschke, T., Anhlan, D., Niehus, S., Müller, J., Azzouz, N., Schwarz, R.T. (2005).** High-level expression of the *Toxoplasma gondii* *STT3* gene is required for suppression of the yeast *STT3* gene mutation. *Mol Biochem Parasitol* 143, 6-11
- Sharma, C. B., Lehle, L., Tanner, W. (1981).** N-glycosylation of yeast proteins: Characterization of the solubilized oligosaccharyl transferase. *Eur. J. Biochem.* 116, 101-108
- Spirig, U., Glavas, M., Bodmer, D., Reiss, G., Burda, P., Lippuner, V., te Heesen, S., Aebi, M. (1997).** The STT3 protein is a component of the yeast oligosaccharyltransferase. *Mol Gen Genet Vol.* 256, No. 6, 628-637
- Spiro, M.J., Spiro, R.G., Bhoyroo, V.D. (1979).** Glycosylation of proteins by oligosaccharide-lipids. *J Biol Chem* 254, 7668-7674
- Szymanski, C.M., Yao, R., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P. (1999).** Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* Vol. 32, No. 5, 1022-1030
- Tai, V.W., Imperiali, B. (2001).** Substrate specificity of the glycosyl donor for oligosaccharyl transferase. *J Org Chem* 66, 6217-6228
- Tarbouriech, N., Charnock, S.J., Davies, G.J. (2001).** Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: A comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J Mol Biol* 314, 655-661
- Turco, S.J., Stetson, B., Robbins, P.W. (1977).** Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 4410-4414
- Ünlgil, U.M., Rini, J.M. (2000).** Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 10, 510-517
- Varki, A. (1993).** Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130
- Vernet, T., Dignard, D., Thomas, D.Y. (1987).** A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene* 52, 225-233
- Vickerman, K. (1976).** The diversity of the kinetoplastid flagellates. *Biol of the kinetoplastida*. Academic Press, NY, Vol. I, 1-34

LITERATURVERZEICHNIS

- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippse, P. (1994).** New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruption in *S. cerevisiae*. Yeast 10, 1793-1808
- Wacker, M., Feldman, M.F., Callewaert, N., Kowarik, M., Clarke, B.R., Pohl, N.L., Hernandez, M., Vines, E.D., Valvano, M.A., Whitfield, C., Aebi, M. (2006).** Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 103, No. 18, 7088-7093
- 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., Aebi, M. (2002).** N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. Coli*. Science Vol. 298, No. 5599, 1790-1793
- Weerapana, E., Glover, K.J., Chen, M.M., Imperiali, B. (2005).** Investigating bacterial N-linked glycosylation: Synthesis and glycosyl acceptor activity of the undecaprenyl pyrophosphate-linked bacillosamine. J Am Chem Soc 127, 13766-13767
- Weerapana, E., Imperiali, B. (2006).** Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. Glycobiol Vol. 16, No. 6, 91-101
- Wiggins, C.A.R., Munro, S. (1998).** Activity of the yeast *MNN1* α -1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. Proc Natl Acad Sci USA 95, 7945-7950
- Wilson, C.M., High, S. (2007).** Ribophorin I acts as a substrate-specific facilitator of N-glycosylation. J Cell Sci 120, 648-657
- Wilson, C.M., Kraft, C., Duggan, C., Ismail, N., Crawshaw, S.G., High, S. (2005).** Ribophorin I associates with a subset of membrane proteins after their integration at the Sec61 translocon. J Biol Chem Vol. 280, No. 6, 4195-4206
- Yan, Q., Lennarz, W.J. (2002a).** Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: A glycosylatable photoprobe binds to the luminal domain of Ost1p. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 99, No. 25, 15994-15999
- Yan, Q., Lennarz, W.J. (2002b).** Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: STT3 is directly involved in the glycosylation process. J Biol Chem Vol. 277, No. 49, 47692-47700
- Yan, Q., Prestwich, G.D., Lennarz, W.J. (1999).** The Ost1p subunit of yeast oligosaccharyl transferase recognizes the peptide glycosylation site sequence , -Asn-X-Ser/Thr-. J Biol Chem Vol. 274, No. 8, 5021-5025
- Yoshida, S., Ikeda, E., Uno, I., Mitsuzawa, H. (1992).** Characterization of a staurosporine- and temperature-sensitive mutant, *stt1*, of *Saccharomyces cerevisiae*: *STT1* is allelic to *PKC1*. Mol Gen Genet 231, 337-344
- Young, N.M., Brisson, J.-R., Kelly, J., Watson, D.C., Tessier, L., Lanthier, P.H., Jarrell, H.C., Cadotte, N., St. Michael, F., Aberg, E., Szymanski, C.M. (2002).** Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. J Biol Chem Vol. 277, No. 45, 42530-42539

LITERATURVERZEICHNIS

Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te Heesen, S., Lehle, L., Aebi, M. (1995).
*STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*.*
EMBO J Vol. 14, No. 20, 4949-4960

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Promotion zur Seite standen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ludwig Lehle bedanken, der es mir ermöglicht hat, an diesem spannenden, wenn auch zum Teil nervenraubenden Thema zu arbeiten. Er hatte stets ein offenes Ohr und stand einem mit Rat zur Seite. Für meine Ideen war er stets aufgeschlossen und ließ mir große Handlungsfreiheit, die ich sehr zu schätzen wusste.

Bei Prof. Dr. Françoise Routier (MHH, Hannover) möchte ich mich für die Bereitstellung der *Leishmania STT3*-Homologe bedanken.

Mein besonderer Dank geht an meine beiden Mitstreiter, Tanja Bickel und Peter Hauptmann, die mich zum Teil schon während der Studienzeit begleitet haben. Mit ihrer Unterstützung wurde so einiges leichter, beruflich und privat. Außerdem geht mein Dank an die Diplomanden Laura Klingseisen, Sonja Nieratschker und Michael Kämpf, die im Endspurt dieser Arbeit für frischen Wind gesorgt haben und mit viel Frohsinn so manch anstrengende Zeit versüßt haben.

Zudem möchte ich bei Angelika Rechenmacher und Michael Schmitzberger bedanken, die mit viel Humor die Zeit im Labor geteilt haben und mir bei einigen Arbeiten zur Hand gegangen sind.

Des Weiteren geht mein Dank an die Mitarbeiter des „anderen Gangs“ - Christian Vogl, Guido Großmann und Stefan Ringlstetter – Danke für die herzliche Atmosphäre, fachliche Kompetenz und so manch lustige Abende. Christian, ganz besonders Danke für die Hilfe bei der Klonierung, die mir ein halbes Jahr Nerven gekostet hat.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mit unerschütterlichem Vertrauen in mein Tun hinter mir gestanden haben und mich immer unterstützten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, den 12.02.2008