

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung  
von Protein O-Mannosyltransferasen der  
Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin -  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Verena Girrbach**

aus Regensburg

Mai 2003



Promotionsgesuch eingereicht am: 21.05.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. S. Strahl

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Kurtz

1. Prüfer: PD Dr. S. Strahl

2. Prüfer: Prof. Dr. S. Modrow

3. Prüfer: Prof. Dr. S. Schneuwly



---

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Protein Glykosylierung</i>	<i>1</i>
1.1.1 Protein O-Glykosylierung in <i>S. cerevisiae</i>	3
1.1.1.1 Die PMT-Familie in <i>S. cerevisiae</i>	6
1.1.1.2 Membrantopologie und charakteristische Domänen der PMT-Familie	7
1.1.1.3 Charakterisierung von Pmt1p als Modellprotein	10
1.1.2 PMT-Homologe höherer Eukaryoten	11
<i>1.2 Struktur und Reaktionsmechanismen von Glykosyltransferasen</i>	<i>13</i>
1.2.1 Strukturelle Eigenschaften von Glykosyltransferasen	13
1.2.2 Reaktionsmechanismen von Glykosyltransferasen	15
<i>1.3 Glykosyltransferase-Komplexe</i>	<i>17</i>
<i>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit</i>	<i>20</i>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Material	22
2.1.1 Organismen	22
2.1.2 Plasmide	23
2.1.2.1 <i>E. coli</i> Vektoren	23
2.1.2.2 <i>E. coli</i> – <i>S. cerevisiae</i> Shuttle-Vektoren	24
2.1.3 Oligonukleotide	25
2.1.4 Medien	28
2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	28
2.1.6 Geräte	30
2.1.7 Internetdienste	30
2.1.8 Software	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Anzuchtbedingungen und Anlegen von Dauerkulturen	31
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	32

2.2.2.4 Klonierungstechniken	32
2.2.2.5 Gezielter Basenaustausch ("Site-directed Mutagenesis")	32
2.2.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.2.7 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	33
2.2.2.8 Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.2.2.9 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.2.2.10 DNA-Sequenzanalyse	33
2.2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.2.12 Klonierung verschiedener Plasmide	34
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.3.1 Proteinbestimmung	38
2.2.3.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen	38
2.2.3.3 Zellwand- und Membranpräparation aus Hefe	39
2.2.3.4 Solubilisierung von Hefe-Membranproteinen	39
2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation solubilisierter Membranproteine	40
2.2.3.6 Fotoaffinitäts-Markierung	40
2.2.3.7 "Blue-native Polyacrylamid Gelelektrophorese" (BN-PAGE)	41
2.2.3.8 Chemische Quervernetzung von Membranproteinen	41
2.2.3.9 Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation	41
2.2.3.10 Extraktion von Zellwandproteinen	42
2.2.3.11 Glykosidase-Verdau	42
2.2.3.12 Pmt <i>in vitro</i> Enzymtests I und II	43
2.2.3.13 Reinigung von GST-Fusionsproteinen	44
2.2.3.14 Affinitätsreinigung der anti-Pmt3-6p Antikörper	44
2.2.3.15 Kopplung polyklonaler Antikörper an Protein A-Sepharose	44
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1 Pmt-Komplexbildung in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.1.1 Pmt-spezifische Antikörper	45
3.1.2 Charakterisierung der PMT1- und PMT2-Familienmitglieder	46
3.1.2.1 Nachweis von Proteinkomplexen über Co-Immunpräzipitation	46
3.1.2.2 Nachweis der Pmt-Komplexe über "Blaue Nativgel-Elektrophorese"	51
3.1.2.3 Pmt Proteinlevel in <i>pmt</i> Doppelmutanten	53

3.1.2.4 Chemische Quervernetzung von Pmt5p-Pmt2p Komplexen	54
3.1.2.5 Mannosyltransferase-Aktivität in <i>pmt</i> Mutanten	55
3.1.2.6 Pmt6p bildet hochmolekulare Komplexe	56
3.1.3 Charakterisierung der PMT4-Subfamilie	58
3.1.3.1 Nachweis hochmolekularer Pmt4p-Komplexe	59
3.1.3.2 Identifizierung eines Pmt4p-Pmt4p Komplexes	60
3.2 Molekulare Charakterisierung der Pmt-Pmt Wechselwirkung	61
3.2.1 Charakterisierung der Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung	61
3.2.1.1 Pmt1p Deletionsmutanten	61
3.2.1.2 Pmt1p Punktmutanten	64
3.2.1.3 Pmt2p Punktmutanten	70
3.2.2 Charakterisierung der Pmt4p-Pmt4p Komplexbildung	74
3.3 <i>Pmt1</i> Funktionsanalyse	77
3.3.1 Charakterisierung der Pmt1p Punktmutanten	77
3.3.1.1 Charakterisierung der Leucin-Mutanten	81
3.3.2 Untersuchungen zur Bindung eines Peptidsubstrats an Pmt1p	84
3.4 DNA-Sequenzkorrektur von <i>PMT2</i>	94
<b>4 Diskussion</b>	<b>96</b>
4.1 <i>Pmt</i> -Komplexe in <i>S. cerevisiae</i>	97
4.1.1 Komplexbildung zwischen PMT1- und PMT2-Familienmitgliedern	98
4.1.1.1 Die paralogen Proteinpaare Pmt1p/Pmt5p und Pmt2p/Pmt3p	98
4.1.1.2 Relevanz der Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe <i>in vivo</i>	99
4.1.2 Pmt6p-spezifische Enzymkomplexe	101
4.1.3 Homomere Pmt4p Komplexe	102
4.1.4 Effiziente Transferaseleistung durch Komplexbildung	104
4.1.5 Allgemeine Prinzipien der Pmtp-Pmtp Wechselwirkung	105
4.2 Essentielle Aminosäuren innerhalb von <i>Pmt1p</i>	107
4.2.1 Funktion von Glu-Resten bei der Katalyse von Glykosyltransferasen	108
4.2.2 Funktion von Leu-Resten bei der Katalyse von Glykosyltransferasen	110
4.2.3 Kompensatorische Effekte von Aminosäure-Substitutionen in Pmt1p	111

<i>4.3 Pmt1p Loop1 ist vermutlich an der Akzeptorbindung beteiligt</i>	<i>111</i>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>7 Eigene Publikationen</b>	<b>134</b>
<b>Anhang I</b>	<b>135</b>
<b>Anhang II</b>	<b>136</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ANB-NOS	N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid
BN-PAGE	"blaue Nativgel Elektrophorese"
BSA	Rinderserumalbumin
CI2	Chymotrypsin Inhibitor 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Natriumdeoxycholat
Dol-P-Man	Dolicholphosphat-Mannose
DPM	Dol-P Mannosyltransferase
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
GnT	GlcNAc-Transferase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSH	Glutathion
GT	Glykosyltransferase
HA	Hämagglutinin
IP	Immunpräzipitat
IP <sub>3</sub> (R)	Inositol 1,4,5-Triphosphat (Rezeptor)
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
MANaseII	α1-2,3,6-Mannosidase
MIR	<u>M</u> annosyltransferase, <u>I</u> P <sub>3</sub> R, <u>R</u> yR
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP40	Nonidet P40
OPA	<i>o</i> -Phtaldialdehyd
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PMT	Protein O-Mannosyltransferase
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SANPAH	N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat
SASD	Sulfosuccinimidyl2-( <i>p</i> -azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-buffered saline
TDP	Thymidindiphosphat
TE	Triton-Extrakt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	L-1-Chloro-3-[4-tosyl-amido]-7-amino-2-heptanon HCL
TM	Transmembranspanne
TPCK	1-Chloro-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

**AMINOSÄUREN**

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

## 1 EINLEITUNG

Bereits während oder nach ihrer Biosynthese werden die meisten Proteine durch verschiedene Prozessierungsreaktionen verändert und erhalten so für ihre Funktion wichtige Eigenschaften. Diese Veränderungen werden allgemein als co- bzw. post-translationale Proteinmodifikationen bezeichnet. Bis heute wurde eine große Vielfalt von Modifikationstypen identifiziert und charakterisiert. Dazu gehören Phosphorylierungen (Cozzzone, 1998; Manning *et al.*, 2002), Acetylierungen (Fu *et al.*, 2002; Freiman und Tjian, 2003), Ubiquitinylierungen (Finley und Varshavsky, 1985; Hershko und Ciechanover, 1992; Ben-Neriah, 2002), Sumoylierungen (Wilson und Rangasamy, 2001; Verger *et al.*, 2003) und Glykosylierungen (Spiro, 2002) – um nur einige zu nennen. Die Modifikationen verändern die biochemischen Eigenschaften der Proteine. So können verschiedene Parameter wie Aktivität, Stabilität oder Transport beeinflusst werden (Koshland, 1987; von Figura, 1991; Hershko und Ciechanover, 1992; Lehle und Tanner, 1995).

### 1.1 PROTEIN GLYKOSYLIERUNG

Die Glykosylierung gehört zu den komplexesten Proteinmodifikationen (Herscovics und Orlean, 1993; Lis und Sharon, 1993; Lehle und Tanner, 1995; Spiro, 2002). Theoretisch kann durch die Kombination einer relativ geringen Anzahl von Monosacchariden eine Vielzahl komplexer Zuckerstrukturen aufgebaut werden, die sich hinsichtlich ihrer Kettenlänge, anomeren Konfiguration ( $\alpha$  oder  $\beta$ ), Verzweigungspunkte und den Positionen glykosidischer Bindungen unterscheiden. In der Zelle erfolgt die Synthese von Oligosacchariden sukzessive, durch die konzertierte Aktion mehrerer Glykosyltransferasen. Jeder Organismus bzw. Zelltyp besitzt, je nach Gen-Ausstattung und -Expression, eigene, spezifische Glykosylierungsmuster (Lis und Sharon, 1993). Proteine, welche kovalent mit Zuckermolekülen verknüpft sind, werden als Glykoproteine bezeichnet. Diese sind in Archaea, Bakteria und Eukarya ubiquitär (Lechner und Wieland, 1989; Kobata, 2000; Schäffer *et al.*, 2001; Wilson, 2002).

Bei Eukaryoten erfolgen die Glykosylierungsschritte zum einen co-translokational, im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), zum anderen post-translational während

der Passage durch den Golgi-Apparat. Dementsprechend handelt es sich bei Glykoproteinen in der Regel um Membranproteine, extrazelluläre und/oder sekretorische Proteine. Eine Ausnahme bildet eine Gruppe von Proteinen im Zellkern und Cytoplasma, die ausschließlich mit N-Acetylglukosamin (GlcNAc)-Monosacchariden modifiziert werden (Hart *et al.*, 1989; O'Donnell, 2002). Aufgrund der Bindungsart von Mono- bzw. Oligosacchariden an die betreffenden Proteinkomponenten, unterscheidet man fünf Glykosylierungstypen.

i) Bei der N-Glykosylierung wird ein "core"-Oligosaccharid, bestehend aus zwei GlcNAc-Resten, neun Mannosen (Man) und drei Glukosen (Glc) ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ ), auf die Amidgruppe einer Asparaginseitenkette übertragen (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Tanner und Lehle, 1987; Abeijon und Hirschberg, 1992). Die Transferreaktion erfolgt dabei ausschließlich auf ein Asparagin der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X= jede beliebige Aminosäure, außer Prolin) oder in Ausnahmen auf Asn-X-Cys (Sato *et al.*, 2000).

ii) Bei dem zweiten Glykosylierungstyp werden unterschiedliche Monosaccharide, wie z.B. N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Galaktose (Gal), oder Fucose (Fuc) auf die Hydroxylgruppen von Serin- bzw. Threoninresten übertragen. Man spricht in diesem Fall von einer O-glykosidischen Bindung (Gemmell und Trimble, 1999; Spiro, 2002). Anders als bei der N-Glykosylierung konnte bisher keine allgemeingültige Konsensussequenz identifiziert werden, welche für die Modifikation spezifischer Serin- oder Threoninreste notwendig ist. Zusätzlich zu Serin und Threonin, können sowohl Hydroxyprolin (Strahm *et al.*, 1981; Kieliszewski *et al.*, 1995), Hydroxylysin (Spiro, 1969; Colley und Baenziger, 1987) als auch Tyrosin (Smythe und Cohen, 1991) O-glykosidisch mit Zuckerresten modifiziert werden.

iii) Eine völlig neue Art von Kohlenhydrat/Protein-Bindung wurde im Labor von Hofsteenge charakterisiert. Bei dieser als C-Glykosylierung bezeichneten Modifikation, wird eine Mannose auf das Indol-C2 Atom einer Tryptophanseitenkette, in der Konsensussequenz Trp-X-X-Trp (Bindung erfolgt an das erste Trp) übertragen (Hofsteenge *et al.*, 1994; de Beer *et al.*, 1995; Krieg *et al.*, 1998).

iv) Eukaryoten besitzen außerdem zahlreiche Zelloberflächen-Proteine, die über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Cytoplasmamembran verankert sind. Der GPI-Anker ist über Phosphoethanolamin, an die letzte Carboxylgruppe bestimmter Proteine gekoppelt. Da Phosphoethanolamin Mannosylreste trägt, zählt diese Art der Modifikation ebenfalls zu den Glykosylierungen (Kinoshita *et al.*, 1997).

v) Einen weiteren, ganz speziellen Glykosylierungstyp stellt die Phosphoglykosylierung dar, bei der Zuckermoleküle über eine Phosphodiesterbindung an Serinreste gebunden werden (Mehta *et al.*, 1996; Haynes, 1998).

Die große Anzahl der Bindungsmöglichkeiten von Kohlenhydraten an Polypeptide macht deutlich, wie vielschichtig diese Art der Proteinmodifikation ist. Obwohl bereits viele Glykosyltransferasen identifiziert und kloniert wurden, ist über die genauen Katalysemechanismen und die strukturellen Eigenschaften, welche die hohe Spezifität gegenüber Substraten vermitteln, nur wenig bekannt. Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung jener Glykosyltransferasen, die in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* den initialen Schritt der Protein O-Glykosylierung katalysieren. Die beteiligte Enzymfamilie ist von der Hefe, bis zum Menschen konserviert. Für eine Struktur- und Funktionsanalyse ist die Bäckerhefe ein idealer Modellorganismus, da sie genetisch leicht manipulierbar ist. Im Folgenden wird ein Überblick über die O-Glykosylierung von *S. cerevisiae* gegeben und bekannte Reaktionsmechanismen von Glykosyltransferasen allgemein beschrieben.

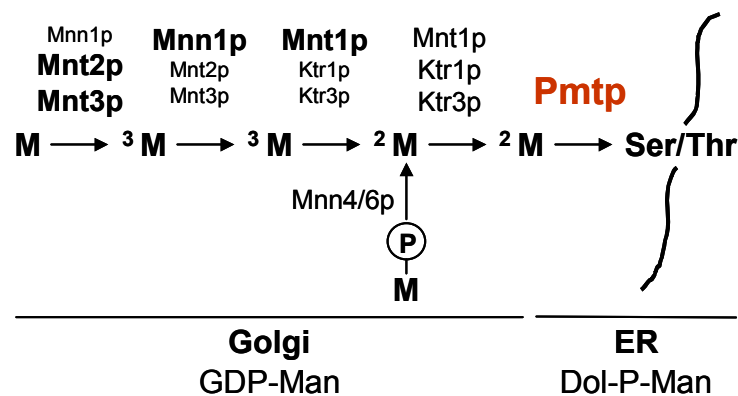
### 1.1.1 Protein O-Glykosylierung in *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* besitzt eine 100 – 200 nm dicke Zellwand, die rund 20 – 30 % des Zell-Trockengewichts ausmacht. Etwa die Hälfte dieses Trockengewichts ist auf Glykoproteine mit hohem Mannoseanteil zurückzuführen (Valentin *et al.*, 1987; Kapteyn *et al.*, 1999). Man spricht hier auch von Mannoproteinen, die sowohl N- als auch O-glykosidisch gebundene Zucker tragen.

O-gebundene Oligosaccharide wurden bei der Bäckerhefe erstmals von Sentandreu und Northcote beschrieben (1969). Diese an Serin oder Threonin gebundenen, unverzweigten Zuckerstrukturen bestehen im Durchschnitt aus 1 – 5 Mannosylresten. Eine weitere Mannose kann am zweiten Saccharidrest über eine Phosphatgruppe gebunden sein (Abb. 1-1) (Nakayama *et al.*, 1998; Jigami und Odani, 1999).

Der Transfer der ersten Mannose auf naszierende Polypeptidketten, erfolgt im ER-Lumen (Marriott und Tanner, 1979; Haselbeck und Tanner, 1983). Dabei wird zunächst auf der cytoplasmatischen Seite des ERs ein Mannosylrest von GDP-Man auf das Polyisoprenoid Dolicholphosphat (Dol-P) übertragen. Katalysiert wird diese Reaktion von dem

essentiellen Enzym Dol-P-Man Synthase (Dpm1p) (Babczinski und Tanner, 1973; Sharma *et al.*, 1974; Haselbeck und Tanner, 1982; Orlean *et al.*, 1988; Orlean, 1990). Durch einen noch nicht geklärten Mechanismus erfolgt die Translokation von Dol-P-Man über die ER-Membran auf die luminal Seite. Der initiale Schritt der O-Mannosylierung wird von den Mitgliedern der Dol-P- $\beta$ -D-Man:Protein O- $\alpha$ -D-Mannosyltransferase (PMT) Familie katalysiert. Mannose wird dabei von dem Donor Dol-P- $\beta$ -D-Man unter Inversion der Konfiguration auf eine Hydroxylgruppe von Serin- oder Threoninseitenketten übertragen – es entsteht eine  $\alpha$ -D-glykosidische Bindung (Larriba *et al.*, 1976; Lehle und Tanner, 1978; Bause und Lehle, 1979). Die Mitglieder der PMT-Familie zählen somit zu den invertierenden Glykosyltransferasen. Da bei dieser Transferreaktion Mannose direkt an das Protein gebunden wird, spricht man auch von Protein O-Mannosylierung.



**Abb. 1-1: Struktur und Biosynthese O-gebundener Oligosaccharide in *S. cerevisiae*.** Protein O-Mannosyltransferasen (Pmt; umfasst die sieben PMT-Familienmitglieder Pmt1-7p) katalysieren im ER den Transfer einer Mannose von Dol-P-Man auf Serin- und Threoninreste bestimmter Polypeptidketten. Die  $\alpha$ 1,2-Mannosyltransferasen Mnt1p, Ktr1p und Ktr3p übertragen im Golgi die zweite und dritte Mannose. Mnn1p, Mnt2p und Mnt3p ( $\alpha$ 1,3-Mannosyltransferasen) sind für die Addition der vierten und fünften Mannose verantwortlich. Mnn4p und Mnn6p übertragen eine Phosphomannose auf den zweiten Saccharidrest. Fett gedruckte Enzymnamen stellen die Hauptaktivität einer Reaktion dar. Alle Golgi-lokalisierten Glykosyltransferasen verwenden GDP-Man als Zuckerdonor.

Welche Serin- bzw. Threoninreste sekretorischer Proteine modifiziert werden ist nicht klar, da bisher keine, für diese Reaktion notwendige Konsensussequenz oder strukturellen Merkmale identifiziert werden konnten. Allerdings zeigte eine *in vitro* Analyse von Peptidsubstraten, eine Präferenz für Threonin gegenüber Serin (Bause und Lehle, 1979; Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). *In vivo* hat sich dies jedoch nicht bestätigt (Jars *et al.*, 1995). Zusätzlich wirkt sich Prolin an Position –1 positiv auf die Transferrate aus (Bause

und Lehle, 1979; Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). Auffallend ist zudem, dass die meisten Proteinsubstrate Serin/Threonin-reiche Domänen besitzen, die z.T. hoch mannosyliert werden.

Die Addition weiterer Mannosen erfolgt im Golgi-Apparat, wobei hier GDP-Man als Zuckerdonor fungiert (Abb. 1-1) (Sharma *et al.*, 1974; Bause und Lehle, 1979; Haselbeck und Tanner, 1983). Drei Proteine, mit redundanter Funktion, sind für die Übertragung der zweiten und dritten,  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannosen verantwortlich: die  $\alpha$ 1,2-Mannosyltransferasen Mnt1p, Ktr1p und Ktr3p (Killertoxin K1 resistent). Nur wenn alle drei korrespondierenden Gene disruptiert sind, findet man eine Akkumulation von O-glykosidisch gebundenen Monosacchariden (Häusler *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1997; Lussier *et al.*, 1999). Die Addition der vierten und fünften  $\alpha$ 1,3-gebundenen Mannosen (Nakajama und Ballou, 1974) wird ebenfalls von drei Proteinen mit überlappenden Enzymaktivitäten katalysiert (vgl. Abb.1-1). Dies sind die  $\alpha$ 1,3-Mannosyltransferasen Mnn1p (Mannan defekt), Mnt2p und Mnt3p (Graham *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 1999). An den zweiten Mannosylrest kann eine weitere Mannose über eine Phosphatgruppe, kovalent gebunden sein. Mnn6p, ein Mitglied der KTR-Familie, katalysiert diese Transferreaktion (Nakajama und Ballou, 1974; Wang *et al.*, 1997; Lussier *et al.*, 1999). Die Mannosylphosphorylierung wird dabei von dem Protein Mnn4p, das selbst keine Transferaseaktivität besitzt, positiv reguliert (Odani *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1998). Die an der hier gezeigten Elongationsreaktion beteiligten Enzyme gehören, wie alle bisher charakterisierten Golgi-Glykosyltransferasen, zu den Typ II Membranproteinen. Sie sind mit einer Membranspanne in der Golgi-Membran verankert, wobei ein kurzer N-Terminus cytoplasmatisch und die große carboxyterminale katalytische Domäne, luminal orientiert ist (Häusler *et al.*, 1992; Yip *et al.*, 1994; Lussier *et al.*, 1995a; Lussier *et al.*, 1997). Ein weiteres typisches Merkmal ist das DxD (auch DxH) Sequenzmotiv, das für alle Glykosyltransferasen, deren Übertragungsreaktion von divalenten Kationen abhängt charakteristisch ist. Die negativ geladenen Aspartatseitenketten spielen bei der Katalyse eine essentielle Rolle (siehe Einleitung 1.2.1) (Wiggins und Munro, 1998; Breton *et al.*, 2001).

### 1.1.1.1 Die PMT-Familie in *S. cerevisiae*

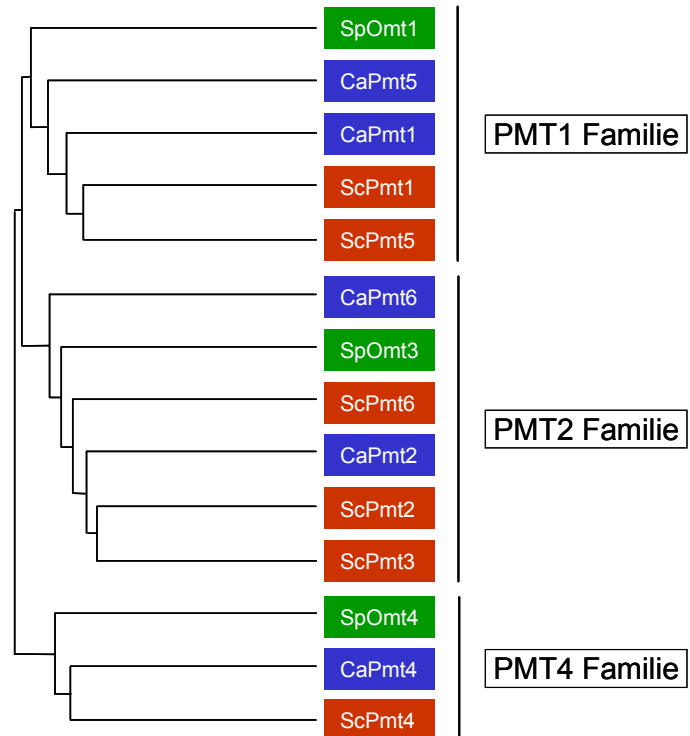
Die O-Mannosylierung stellt für die Bäckerhefe eine essentielle Proteinmodifikation dar. Dies konnte Gentzsch und Tanner mit Hilfe von Disruptionen verschiedener *PMT*-Gene zeigen (Gentzsch und Tanner, 1996). *S. cerevisiae* besitzt insgesamt sieben *PMT*-Homologe (*PMT1-7*) (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993; Immervoll *et al.*, 1995; Lussier *et al.*, 1995b; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Einfachdisruptionen der Gene *PMT1-PMT6* haben keinen gravierenden Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen. Dagegen zeigen die Mehrfachmutanten *pmt2pmt3*, *pmt2pmt4* und *pmt1pmt2pmt3* einen osmo- und temperatursensitiven Phänotyp, der Wachstum nur auf osmotisch stabilisiertem Medium (z.B. Zugabe von 1 M Sorbit) und bei permissiver Temperatur erlaubt. Zusätzlich sind diese Hefemutanten sensitiv gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien wie SDS und Calcofluor white. Die Dreifachdisruptionen *pmt1pmt2pmt4* und *pmt2pmt3pmt4* erwiesen sich als letal. Hefezellen benötigen also für normales Wachstum ein gewisses Maß an O-Mannosylierung. Die Zellwanddefekte einiger *PMT*-Mutanten weisen zudem darauf hin, dass diese Proteinmodifikation für die Integrität der Zellwand unabdingbar ist (Gentzsch und Tanner, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Durch die Charakterisierung verschiedener O-glykosylierter Proteine, konnte bisher für Pmt1-4p und Pmt6p eine direkte Beteiligung an der O-Mannosylierungsreaktion nachgewiesen werden (Gentzsch und Tanner, 1996, 1997).

Die Protein O-Mannosylierung ist unter Pilzen eine verbreitete Proteinmodifikation und wurde unter anderem in *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, *Hansenula holstii*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium sonai pisi* und in *Aspergillus*-Spezies nachgewiesen (Tanner und Lehle, 1987; Duman *et al.*, 1998; Palamarczyk *et al.*, 1998; Ernst und Prill, 2001; Willer *et al.*, 2002). In allen bisher untersuchten Pilzen erfolgt die O-Mannosylierung wie in der Bäckerhefe, indem im ER-Lumen ein Mannosylrest von Dol-P-Man auf sekretorische Proteine übertragen wird. Pmtp Orthologe konnten in mehreren Hefen und Pilzen nachgewiesen werden, wie z.B. in *C. albicans* (CaPmt1-2p und CaPmt4-6p) (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000) und *S. pombe* (SpOmt1-3p; O-Mannosyltransferase) (Willer und Strahl, unveröffentlicht).

Die Familie der PMTs lässt sich mittels phylogenetischer Analysen in drei Untergruppen einteilen (PMT1-, PMT2- und PMT4-Subfamilie) (Willer *et al.*, 2002). In den Hefen *C.*



*albicans* und *S. cerevisiae* sind die PMT1- und PMT2-Familienmitglieder redundant, wohingegen in der PMT4-Subfamilie jeweils nur ein Enzym vertreten ist. Die Spalthefe *S. pombe* besitzt insgesamt nur drei *PMT*-Homologe (*OMTs*), die jeweils den PMT1-, PMT2- und PMT4-Familien zugeordnet werden können (Abb. 1-2) (Willer, 2002).



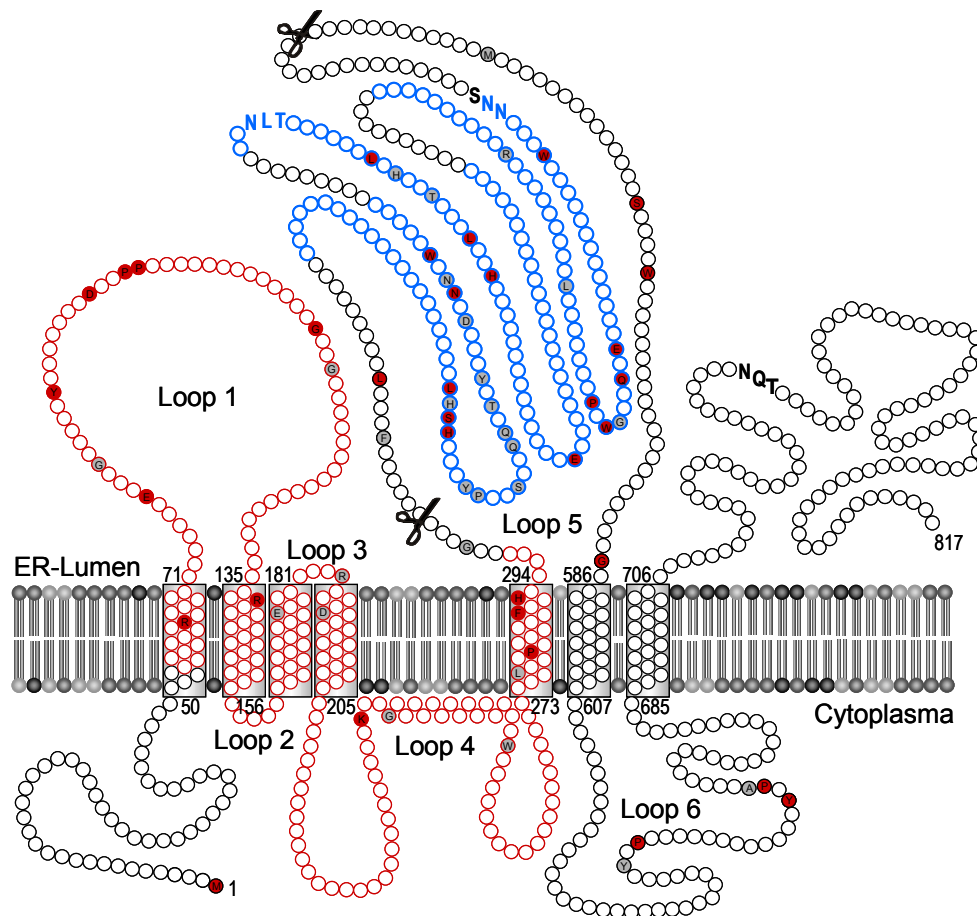
**Abb. 1-2: Phylogenie der PMT-Familie.** Gezeigt ist der Verwandtschaftsgrad der Pmtps aus *S. pombe* (Sp; grün), *C. albicans* (Ca; blau) und *S. cerevisiae* (Sc; rot).

Die Mannosyltransferasen der Bäckerhefe sind auf Proteinebene zu ~50 – 80 % homolog. Darüber hinaus zeigen die Hydropathieprofile der Enzymfamilie fast identische, dreigeteilte Proteinstrukturen, mit mehreren putativen Membranspannen am N- bzw. C-terminalen Bereich und einer zentralen hydrophilen Domäne. Dies deutet auf eine große strukturelle Verwandtschaft hin (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

### 1.1.1.2 Membrantopologie und charakteristische Domänen der PMT-Familie

Pmtps sind integrale ER-Membranproteine. 1999 gelang es Strahl-Bolsinger und Scheinost die Membrantopologie der Mannosyltransferase Pmt1p, zu klären (siehe dazu Abb. 1-3) (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Demzufolge durchspannt die 817 Aminosäuren lange Polypeptidkette die ER-Membran 7-mal, wobei der N-Terminus cytoplasmatisch und der C-Terminus luminal orientiert ist. Die im Hydropathieprofil vorhergesagte hydrophile Domäne liegt auf der ER Lumenseite, und wird N-terminal von fünf und C-terminal von zwei Transmembranspannen (TM) flankiert. Diese Membrantopologie ist für Glykosyltransferasen bisher einzigartig. Alle Golgi-lokalisierten, Kohlenhydrat-

übertragenden Enzyme zeigen, wie bereits erwähnt, eine Typ II Membrantopologie. Über die Struktur ER-residenter Glykosyltransferasen ist dagegen nur wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass einige im ER lokalisierten Glykosyltransferasen mehrere putative Membranspannen besitzen, wobei die Strukturen noch nicht eindeutig charakterisiert sind (Dan *et al.*, 1996; Menon *et al.*, 1997; Knauer und Lehle, 1999b; Oriol *et al.*, 2002).



**Abb. 1-3: Pmt1p Topologiemodell.** Rot hinterlegte Kreise zeigen die in allen Pmtps identischen, grau hinterlegte die hoch konservierten Aminosäuren (AS) an. Der rot markierte Bereich von TM I – V wird als PMT-Domäne, und die blauen Bereiche als MIR-Domänen (Mannosyltransferase, IP<sub>3</sub>R, RyR) bezeichnet. Groß gedruckte Buchstaben entsprechen N-Glykosylierungsstellen; die Scheren zeigen den in der Mutante Pmt1p  $\Delta$ 304-531 deletierten Abschnitt an (siehe Text, Abschnitt 1.1.1.3).

Pmtps weisen unterschiedliche, für diese Familie charakteristische Domänen auf. Ein Bereich, der die Membranspannen I bis einschließlich V umfasst, wird gemäß PFAM- (Protein families) und SMART-Datenbank (simple modular architecture research tool; siehe 2.1.7), als PMT-Domäne bezeichnet (Abb. 1-3, rot markiert). Homologe Abschnitte

wurden auch in verschiedenen hypothetischen, prokaryotischen Proteinen identifiziert (PFAM-Datenbank). Über die möglichen Funktionen dieser putativen Genprodukte ist jedoch nichts bekannt.

Im mittleren, hydrophilen Bereich der Pmtps finden sich Peptidabschnitte, die eine signifikante Homologie zu Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR) aufweisen (Zeller, 1999; Ponting, 2000). Aufgrund dieser Homologie werden die Sequenzabschnitte als MIR-Domänen (für Mannosyltransferase, IP<sub>3</sub>R und RyR) bezeichnet. Bei den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren handelt es sich um in der ER-Membran lokalisierte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die sich nach Bindung des Signalmoleküls Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) öffnen, um das im ER-Lumen gespeicherte Ca<sup>2+</sup> ins Cytoplasma zu entlassen (Kiselyov und Muallem, 1999; MacKrell, 1999). IP<sub>3</sub>R sind, in Bezug auf N- und C-Terminus, strukturell mit Ry-Rezeptoren verwandt (MacKrell, 1999), die ebenfalls zur Familie der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zählen. RyR spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion, da sie nach Depolarisation der Zellmembran, den Ca<sup>2+</sup>-Austritt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ermöglichen (MacKrell, 1999; Stokes und Wagenknecht, 2000). IP<sub>3</sub>R und RyR weisen in ihren cytoplasmatisch orientierten Aminotermi jeweils vier MIR-Domänen auf (Ponting, 2000). Die Funktion dieser homologen Peptidabschnitte ist nicht geklärt. Im Falle der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass ein Teilabschnitt des N-Terminus (inklusive MIR-Domänen III und IV) an der IP<sub>3</sub>-Bindung beteiligt ist (Yoshikawa *et al.*, 1996). Des weiteren interagiert der N-terminale Bereich des Typ 1 RyR (AS 163 – 522) – welcher die MIR-Domänen II bis IV einschließt – intramolekular mit den Aminosäureresten 2937 – 3225 (Zorzato *et al.*, 1996). Ähnliche Wechselwirkungen wurden für Typ 1 IP<sub>3</sub>R gefunden (Joseph *et al.*, 1995). Ob die homologen MIR-Sequenzen bei der Interaktion bzw. IP<sub>3</sub>-Bindung eine wichtige strukturelle Rolle spielen ist jedoch nicht bekannt. Protein O-Mannosyltransferasen besitzen im Gegensatz zu den Rezeptorproteinen nur drei MIR-Domänen, die im ER-orientierten Loop 5 lokalisiert sind (Abb. 1-3, blau markierte Bereiche).

Des weiteren konnten bei ER-lokalisierten SDF- (stromal cell-derived factor) bzw. SDF2L1- (SDF 2-like 1) Proteinen aus Mensch und Maus, ebenfalls drei MIR-Domänen identifiziert werden (Ponting, 2000). Diese löslichen Proteine zeigen eine signifikante Homologie zur hydrophilen Loop 5 Domäne der Pmtps (Meunier *et al.*, 2002). Welche Rolle diese Proteine *in vivo* spielen, ist nicht bekannt. SDF2L1 wurde vor kurzem mit

anderen Chaperonen und Faltungsenzymen in einem Multiproteinkomplex detektiert, der mit naszierenden Polypeptiden interagiert (Meunier *et al.*, 2002). Die genaue Funktion der SDF2L1 Untereinheit liegt allerdings noch im Dunkeln.

PMT- und MIR-Domänen sind absolut typisch für alle bisher charakterisierten Pmtps und können somit als Signatur dieser Familie gewertet werden.

### **1.1.1.3 Charakterisierung von *Pmt1p* als Modellprotein**

Pmt1p wurde von allen Familienmitgliedern bisher am eingehendsten charakterisiert. Dies ist unter anderem dem Umstand zu verdanken, dass die Mannosyltransferase-Aktivität von Pmt1p (und Pmt2p) in einem *in vitro* Enzymtest bestimmt werden kann. Dabei wird die Übertragung eines radioaktiv markierten Mannosylrestes von Dol-P-[<sup>14</sup>C]Man auf den Threoninrest des Akzeptorpeptids Acetyl-YATAV-NH<sub>2</sub> verfolgt (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). Gentzsch und Mitarbeiter konnten so beispielsweise zeigen, dass durch Überexpression von Pmt1p oder Pmt2p keine Steigerung des *in vitro* Mannosyltransfers erreicht wird (Gentzsch *et al.*, 1995). Erst bei gemeinsamer Überexpression von Pmt1p und Pmt2p war eine Aktivitätssteigerung möglich. Dies deutete bereits auf eine Interaktion der Transferasen hin und wurde schließlich biochemisch, durch die Reinigung des Pmt1p-Pmt2p Enzymkomplexes bestätigt. Diese Protein/Protein Wechselwirkung erwies sich für eine effiziente *in vitro* Mannosyltransferase-Leistung als unabdingbar (Gentzsch *et al.*, 1995; Girrbach *et al.*, 2000).

Basierend auf dem Topologiemodell wurde in einer ersten Funktionsanalyse, der luminal orientierte Loop 5 von Pmt1p entfernt (Aminosäuren (AS) Δ304-531; siehe Abb. 1-3). Diese Deletionsmutante war nicht mehr in der Lage, das in Wildtyp-Hefezellen stark O-mannosylierte Protein Chitinase (Cts1p) (Kuranda und Robbins, 1991) *in vivo* vollständig zu glykosylieren (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Zudem wurde auch *in vitro* nur noch eine minimale Enzymaktivität nachgewiesen. Die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung war durch die Deletion nicht gestört (Girrbach, 1999; Girrbach *et al.*, 2000). Damit konnte zum ersten mal eine für die Pmtp-Enzymaktivität essentielle Domäne identifiziert werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit erfolgte eine weitere strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Pmt1p als Modellprotein (siehe auch Ergebnisteil 3.2.1.1). Hierfür

wurden mehrere Bereiche innerhalb der Mannosyltransferase deletiert und die rekombinanten Proteine hinsichtlich ihrer *in vitro* Aktivität und Fähigkeit zur Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion des C-Terminus (AS  $\Delta$ 732-817) weder einen Einfluss auf die Mannosyltransferase-Aktivität, noch auf die Interaktion mit Pmt2p hat. Dieser Bereich spielt für die Funktionalität des Enzyms also keine Rolle. Deletionen im Bereich der PMT-Domäne (vgl. Abb. 1-3) hatten dagegen immer den Verlust der Protein/Protein Wechselwirkung, und damit auch der *in vitro* Enzymaktivität zur Folge (Girrbach, 1999; Girrbach *et al.*, 2000). Die PMT-Domäne ist somit für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung entscheidend.

Pmt1p besitzt insgesamt drei putative N-Glykosylierungsstellen: zwei im Loop 5 (N<sup>390</sup>LT, N<sup>513</sup>NS) und eine am C-Terminus (N<sup>743</sup>QT; vgl. Abb. 1-3). Diese Konsensusmotive sind innerhalb der PMT-Familie nicht konserviert. Eine erste Charakterisierung des Proteins ergab, dass Pmt1p *in vivo* N-glykosyliert wird (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). Der gezielte Austausch von Asn390 und Asn743 gegen Alanin zeigte, dass die N-gebundenen Oligosaccharide keinen Einfluss auf die *in vitro* Mannosyltransferase-Aktivität haben (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust aller N-gebundenen Zuckerstrukturen zu einer Aktivitätsabnahme und/oder veränderten Proteinstabilität führt.

### 1.1.2 PMT-Homologe höherer Eukaryoten

O-gebundene Oligosaccharide höherer Eukaryoten sind, im Vergleich zur Bäckerhefe, hinsichtlich ihrer Kettenlänge, Zusammensetzung der Zuckerkomponenten und Verzweigung sehr heterogen (Varki und Freeze, 1994; Van den Steen *et al.*, 1998; Brockhausen, 1999). Die Glykosylierungsreaktion beginnt oft mit der Übertragung eines GalNAc-Restes auf Serin- oder Threoninseitenketten sekretorischer Proteine (Beyer *et al.*, 1981; Carraway und Hull, 1991; Hanisch, 2001). Man findet aber auch O-gebundene Fucosen (Harris *et al.*, 1992), Galaktosen (Muir und Lee, 1970; Reid, 1979; Spiro und Bhoyroo, 1980), Glukosen (Nishimura *et al.*, 1989) und Xylosen (Ruoslahti, 1988). Die Initiation der bisher bekannten O-Glykosylierungsreaktionen erfolgt, ebenfalls anders als bei Hefe, post-translational im Golgi-Kompartiment. Hier findet anschließend auch die Kettenverlängerung statt (Roth, 1987; Opat *et al.*, 2001).

Lange Zeit hielt man die O-Mannosylierung für eine Proteinmodifikation, die ausschließlich in Hefen und filamentösen Pilzen vorkommt. Umso überraschender war die Entdeckung eines Glykoproteins in Rindernerven ( $\alpha$ -Dystroglycan), mit O-glykosidisch gebundenen Mannosen (Chiba *et al.*, 1997). Im gleichen Jahr wies die Gruppe um T. Feizi Glykopeptide aus Hasenhirn mit O-mannosidisch verknüpften Zuckerstrukturen nach (Yuen *et al.*, 1997). Weitere Berichte deuten darauf hin, dass die O-Mannosylierung von Proteinen weiter verbreitet ist, als zunächst angenommen (Sasaki *et al.*, 1998; Smalheiser *et al.*, 1998). Enzyme, die Mannosylreste auf Serin- oder Threoninseitenketten übertragen, müssen demnach auch in höheren Eukaryoten vorhanden sein.

Dank der Genom-Sequenzierungsprojekte konnten *PMT*-Homologe in verschiedenen mehrzelligen Eukaryoten identifiziert werden. *Drosophila* besitzt beispielsweise zwei Proteine – *twisted (tw)* und *rotated abdomen (rt)* – die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz den PMT2- und PMT4-Familien zugeordnet werden können (Martin-Blanco und Garcia-Bellido, 1996; Willer *et al.*, 2002). Mutanten die in den jeweiligen Genen defekt sind, zeigen einen ähnlichen Phänotyp, mit verdrehten Abdomen und einer gestörten embryonalen Muskelentwicklung (Martin-Blanco und Garcia-Bellido, 1996). Darüber hinaus wurden jeweils zwei *PMT*-Homologe aus Maus (*mPomt1* und *Pomt2*, für Protein O-Mannosyltransferase) und Mensch (*hPOMT1* und *POMT2*) kloniert und charakterisiert (Jurado *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2002). Phylogenetisch lassen sich die putativen Mannosyltransferasen ebenfalls den PMT2- und PMT4-Subfamilien zuordnen; PMT1-Familienmitglieder wurden in diesen Organismen nicht gefunden. Defekte im *hPOMT1* Gen, konnten kürzlich mit der schwerwiegenden neuronalen Migrationserkrankung, dem "Walker-Warburg" Syndrom, in Verbindung gebracht werden (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002). Eine Deletion der Mausgene *Pomt1* und *Pomt2* führt dagegen zum Absterben der Embryonen in einer sehr frühen Entwicklungsphase (Willer, persönliche Mitteilung). Diese Daten belegen, dass *PMT*-Homologe in höheren Eukaryoten eine essentielle Rolle während der Embryonalentwicklung spielen. Allerdings konnte bisher für keines der hier beschriebenen Proteine Mannosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

Protein O-Mannosyltransferasen sind somit von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Eine Ausnahme bilden jedoch Pflanzen und der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. In den bereits vollständig durchsequenzierten Organismen *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Reis) und *C. elegans* konnten keine *PMT*-Homologen identifiziert werden (Willer und

Strahl, persönliche Mitteilung). Diese Tatsache macht die Pmtps zu einem möglichen Ziel für die Entwicklung von Fungiziden, um beispielsweise phytopathogene Pilze gezielt zu bekämpfen. Um wirksam hemmende Substanzen entwickeln zu können, ist es hilfreich, Struktur und Funktionsmechanismen der Mannosyltransferasen im Detail zu verstehen. Diese Arbeit leistet diesbezüglich, durch die grundlegende Charakterisierung der PMT-Familie in *S. cerevisiae*, einen wertvollen Beitrag.

## 1.2 STRUKTUR UND REAKTIONSMCHANISMEN VON GLYKOSYLTRANSFERASEN

Es gibt, wie bereits erwähnt, zahlreiche Glykosyltransferasen – jede mit einer eigenen Donor-, Akzeptor- und Bindungsspezifität. Diese werden auf Basis von PSI-BLAST Sequenzanalysen (2.1.7) einerseits und Substrat/Produkt Spezifitäten andererseits, in 65 Familien eingeteilt (CAZY-Datenbank, Carbohydrate-active Enzymes; siehe 2.1.7) (Sinnot, 1990; Campbell *et al.*, 1997). Mittlerweile wurden mehr als 7000 bekannte und putative Glykosyltransferasen in dieser Datenbank registriert und klassifiziert, wobei die Zahl neu identifizierter Enzyme ständig zunimmt. Die Mehrheit der gelisteten Enzyme katalysiert den Transfer UDP- bzw. TDP-aktivierter Zuckermoleküle auf diverse Substrate (Hu und Walker, 2002).

### 1.2.1 Strukturelle Eigenschaften von Glykosyltransferasen

Die große Vielfalt an Donor- und Akzeptor-Molekülen lässt vermuten, dass Glykosyltransferasen signifikante strukturelle Unterschiede aufweisen. Vrielink und Mitarbeitern gelang es 1994 erstmals, die Struktur einer Glykosyltransferase aufzuklären (Vrielink *et al.*, 1994). Seither wurden 16 weitere Zucker-übertragende Enzyme, sowohl von pro- als auch von eukaryotischen Organismen kristallisiert (Pedersen *et al.*, 2000; Bourne und Henrissat, 2001; Gibson *et al.*, 2002; Hu und Walker, 2002; Hu *et al.*, 2003). Überraschend war, dass sich die untersuchten Glykosyltransferasen trotz fehlender Sequenzhomologie, strukturell in nur zwei Superfamilien (GT-A und GT-B; Glykosyltransferase) einteilen lassen (Ünlilgil und Rini, 2000; Bourne und Henrissat, 2001). Dabei sind invertierende und nicht invertierende Glykosyltransferasen jeweils in

beiden Gruppen vertreten. Die bisher kristallisierten Enzyme verwenden ausschließlich Nukleotid-aktivierte Zuckerdonatoren.

In der GT-A Superfamilie findet man vorwiegend Golgi- und ER-lokalisierte, sowie einige prokaryotische Glykosyltransferasen (Charnock und Davies, 1999; Gastinel *et al.*, 2001). Charakteristisch für diese Enzymgruppe ist ein DxD Sequenzmotiv und die Abhängigkeit von divalenten Metall-Ionen wie  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$ . Das Metall-Ion ist für den Katalysemechanismus essentiell und "verankert" die Pyrophosphorylgruppe des Zuckernukleotids im aktiven Zentrum (Wiggins und Munro, 1998; Breton und Imberty, 1999; Breton *et al.*, 2001). Die Strukturdaten zeigen zwei unterschiedliche Domänen, wobei eine die Nukleotid- und die andere die Akzeptorbindung vermittelt. PSI-BLAST Sequenzanalysen und "Protein-threading" ("alignment" von Aminosäuresequenzen mit dreidimensionalen Strukturen) legen nahe, dass weitere Glykosyltransferase-Familien GT-A-ähnliche Strukturen aufweisen (Ünlilil und Rini, 2000; Bourne und Henrissat, 2001).

Die Mitglieder der GT-B Superfamilie besitzen eine Zwei-Domänen Struktur, bei der jede die Topologie von mehreren alternierenden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern einnimmt ( $\alpha/\beta/\alpha$ ). Diese Struktur ähnelt der sogenannten Rossmann-Faltung, einer typischen Nukleotid-Bindedomäne (Breton und Imberty, 1999; Hu und Walker, 2002). Im Unterschied zur GT-A Superfamilie, benötigen die bisher charakterisierten GT-B Enzyme keine Metall-Ionen für die Transferreaktion, obwohl für manche eine Aktivitätssteigerung in Gegenwart bestimmter divalenter Kationen gemessen wurde (Morera *et al.*, 2001). Dieser Effekt kann derzeit nicht erklärt werden. Das für die Donorbindung notwendige Sequenzmotiv ist bei den Mitgliedern der GT-B Superfamilie konserviert. Es besteht aus mehreren Prolin-, Glycin- und einigen anderen invarianten Resten und gilt als Signatur für GT-B Enzyme (Mulichak *et al.*, 2001; Wrabl und Grishin, 2001; Hu und Walker, 2002). Die GT-B Superfamilie ist insgesamt sehr heterogen. Zu ihr zählen vorwiegend prokaryotische Enzyme, die sekundäre Metabolite glykosylieren oder in der Zellwandbiosynthese beteiligt sind (Ha *et al.*, 2000). Des weiteren zählen zahlreiche putative Glukuronosyltransferasen, Insekten- und Pflanzen-Glykosyltransferasen, sowie 30 % aller Zucker-übertragenden Enzyme von *C. elegans* zu dieser Gruppe. Interessanterweise findet man hier auch die O-GlcNAc-Transferasen, die nukleäre und cytoplasmatische Proteine post-translational modifizieren (Hu und Walker, 2002; Zachara und Hart, 2002).

Bisher sind also nur zwei strukturelle Lösungen für das Problem der Übertragung von Nukleotid-aktivierten Monosacchariden bekannt. Es ist allerdings nicht auszuschließen,



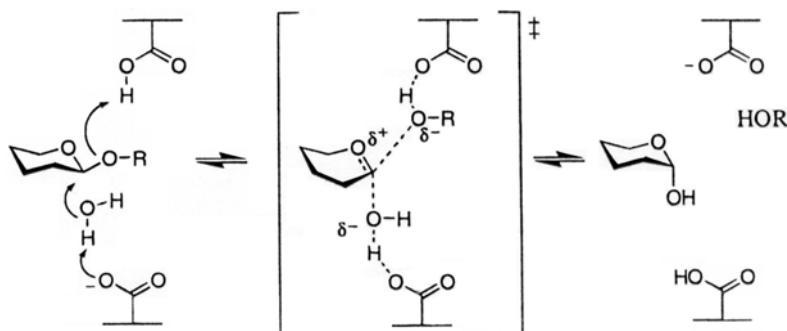
dass Enzyme, die keine Nukleotid-aktivierten Kohlenhydrate als Donatoren verwenden, andere Strukturmerkmale aufweisen. Zudem ist trotz der bisherigen Kristalldaten nicht klar, welche Motive eine bestimmte Substratspezifität vermitteln. Dies ist insofern schwierig zu bestimmen, da beispielsweise in einem beschriebenen Fall die Spezifität gegenüber einem Zuckerdonor nur durch eine einzige Aminosäure determiniert wird (Seto *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2003). Weitere Strukturdaten werden nötig sein, um diese Frage zu klären.

Die Pmt Proteine der Bäckerhefe gehören zu der Glykosyltransferase-Familie 39 (GT 39; CAZY-Datenbank), welcher auch die restlichen, bisher identifizierten *PMT*-Homologen angehören. Zudem findet man in dieser Familie putative Glykosyltransferasen verschiedener Pro- und Eukaryoten, sowie SDF-homologe Proteine aus Maus, Mensch, *Drosophila*, *C. elegans* und *A. thaliana*. Bisher konnte diese Familie weder der GT-A, noch der GT-B Superfamilie zugeordnet werden, was auf strukturelle Besonderheiten hindeuten könnte.

### 1.2.2 Reaktionsmechanismen von Glykosyltransferasen

Invertierende Glykosyltransferasen verändern die Stereochemie an der C1-Position des Zuckerdonors. Der Mechanismus wurde v.a. bei Glykosidasen, also Zucker-spaltenden Enzymen, eingehend untersucht (Wang *et al.*, 1994; Ly und Withers, 1999; Zechel und Withers, 2000). In invertierenden Glykosidasen fungieren zwei Carboxylgruppen von Aspartat- oder Glutamatseitenketten, als Säure/Base Katalysatoren. Diese sind durchschnittlich 10,5 Å voneinander entfernt, damit Wasser- und Substratmolekül binden können (McCarter und Withers, 1994). Eine Carboxylgruppe wirkt basenkatalytisch, indem es das Wassermolekül angreift, während die andere Carboxylgruppe als Säurekatalysator bei der Spaltung der Zuckerbindung assistiert (Abb. 1-4). Die Katalyse erfolgt nach einer nukleophilen Substitution zweiter Ordnung ( $S_N2$ ) (Ly und Withers, 1999; Zechel und Withers, 2000). Invertierende Glykosyltransferasen, die in einem ersten Reaktionsschritt ebenfalls eine glykosidische Bindung spalten müssen, bevor sie den Kohlenhydratrest auf bestimmte Substrate übertragen können, arbeiten nach dem selben Prinzip. Der einzige Unterschied besteht darin, dass hier das Wassermolekül durch den nukleophilen Akzeptor (beispielsweise andere Zuckermoleküle oder

Serin/Threoninseitenketten etc.) ersetzt wird (Sinnot, 1990; Ünlügil und Rini, 2000). Die Beteiligung von negativ geladenen Aminosäuren als Säure/Base Katalysatoren bei Transferreaktionen, konnte durch Kristallstrukturanalysen und den gerichteten Austausch der entsprechenden funktionellen Gruppen bestätigt werden (Ohtsubo *et al.*, 2000; Bourne und Henrissat, 2001; Hu und Walker, 2002).

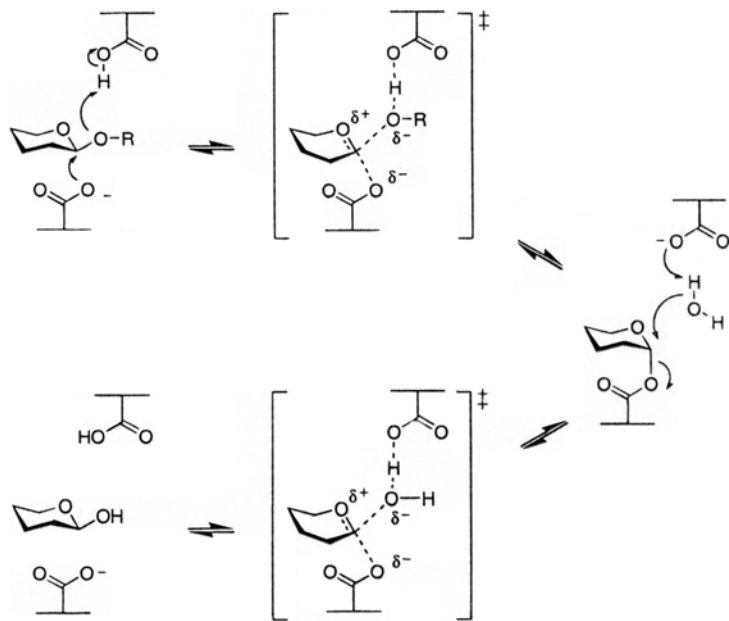


**Abb. 1-4: Allgemeiner Mechanismus invertierender Glykosidasen.** Abbildung nach Zechel und Withers (2000). Erläuterung siehe Text.

Bei nicht invertierenden Enzymen bleibt die Stereochemie des Saccharids erhalten. Auch hier sind zwei Carboxylgruppen als Säure/Base Katalysatoren an der Reaktion beteiligt, die durchschnittlich nur 5,5 Å voneinander entfernt liegen (McCarter und Withers, 1994). Die eine Carboxylgruppe protoniert das glykosidische Sauerstoffatom, was zum Bruch der glykosidischen Bindung führt. Gleichzeitig fungiert die zweite Carboxylgruppe als Nukleophil und bildet ein kovalentes Glykosyl/Enzym Intermediat (Abb. 1-5). Bei diesem Reaktionsschritt wird die Konfiguration des Saccharids invertiert. Die zweite Reaktion erfolgt analog zum Mechanismus invertierender Enzyme (vgl. Abb. 1-4) (Ly und Withers, 1999; Zechel und Withers, 2000). Das heißt auch in diesem Reaktionsschritt wird die Konfiguration des Zuckers invertiert, was in der Summe zur Erhaltung der Stereochemie vor und nach der Transferreaktion führt. Ob dieser Retentionsmechanismus, bei Glykosyltransferasen im Detail zutrifft, ist nach wie vor nicht gesichert, da bisher noch keine kovalenten Glykosyl/Enzym Intermediate nachgewiesen werden konnten (Zechel und Withers, 2000).

**Abb. 1-5: Allgemeiner Mechanismus nicht invertierender Glykosidasen.**

Abbildung nach Zechel und Withers (2000). Erläuterung siehe Text.



### 1.3 GLYKOSYLTRANSFERASE-KOMPLEXE

In den letzten Jahren verdichteten sich die Hinweise, dass Glykosyltransferasen nicht nur in monomerer Form, sondern auch als Dimere und/oder in hochmolekularen Enzymkomplexen aktiv sind (Colley, 1997; Breton *et al.*, 2001). Warum diese Komplexe gebildet werden und welche molekularen Mechanismen zugrunde liegen, ist nur wenig verstanden. Das wohl bekannteste Beispiel eines hochmolekularen Glykosyltransferase-Komplexes ist die im ER lokalisierte Oligosaccharyltransferase (OST), welche "core"-Oligosaccharide auf Asparaginreste naszierender Polypeptidketten überträgt (Fu *et al.*, 1997; Knauer und Lehle, 1999b). In der Bäckerhefe sind insgesamt neun verschiedene Membranproteine am Aufbau des Komplexes beteiligt, wobei fünf für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell sind (Karaoglu *et al.*, 1997; Spirig *et al.*, 1997; Knauer und Lehle, 1999a, b). Welche Aufgaben die einzelnen Proteinuntereinheiten im Komplex übernehmen, ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Yan und Lennarz konnten beispielsweise zeigen, dass die hoch konservierte Stt3p-Untereinheit (Staurosporin und temperatursensitiv) eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Asn-X-Ser/Thr Konsensussequenz spielt und/oder direkt im katalytischen Prozess involviert ist (Yan und Lennarz, 2002a, b). Zudem zeigen die kürzlich publizierten Daten aus dem Labor von M. Aebi, dass ein Stt3p-homologes Protein aus dem enteropathogenen Bakterium

*Campylobacter jejuni* (pglB) für die Katalyse N-gebundener Oligosaccharide notwendig ist (Wacker *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass Stt3p tatsächlich die katalytische Untereinheit des OST-Komplexes sein könnte. Einer weiteren Proteinuntereinheit – Ost4p – welche nur aus 36 Aminosäuren besteht, wurde eine Funktion bei der Assemblierung und Stabilisierung des OST-Komplexes zugeschrieben (Kim *et al.*, 2000). Mit Hilfe gerichteter Mutagenese und biochemischen Methoden wird versucht, weitere Struktur- und Funktionsdaten für die einzelnen Untereinheiten zu erhalten, um den molekularen Ablauf der Transferasereaktion besser verstehen zu können.

Die Transferaseaktivität des integralen ER-Membranproteins UDP-GlcNAc:Dolichol-P GlcNAc-1-P Transferase (GPT) aus Hamster, wird durch eine homomere Protein/Protein Wechselwirkung beeinflusst. Das Enzym katalysiert auf der cytoplasmatischen Seite des ERs die Synthese von Dol-P-P-GlcNAc, einer Vorstufe des "core"-Oligosaccharids, welches für die N-Glykosylierung benötigt wird (Dan *et al.*, 1996). Dabei zeigt das Homooligomer eine hohe Enzymaktivität, während die entsprechenden Monomere eine vergleichsweise geringe Aktivität aufweisen (Dan und Lehrman, 1997). Die Bildung des Enzymkomplexes könnte in diesem Fall eine wichtige regulatorische Rolle spielen.

Bei Golgi-residenten Glykosyltransferasen wurden Unterschiede im Oligomerisierungsverhalten zwischen den im frühen und im späten Golgi lokalisierten Enzymen beobachtet. So bilden beispielsweise die humanen Glykosyltransferasen des medialen Golgi-Kompartiments, GlcNAc-Transferase I und II (GnT), hochmolekulare Enzymkomplexe, während die im späten Golgi lokalisierten  $\beta$ 1,4-Galaktose- und  $\alpha$ 1,2-Fucose-Transferasen in monomerer oder dimerer Form vorliegen (Opat *et al.*, 2000). Es wird spekuliert, dass die Bildung von homo- bzw. heterooligomeren Komplexen, den Transport von Glykosyltransferasen in spätere Kompartimente verhindert (Colley, 1997; Füllekrug und Nilsson, 1998). Die Oligomerisierung stellt in diesem Fall also einen möglichen Retentionsmechanismus für Golgi-Transferasen dar. Yamaguchi und Fukuda konnten zudem zeigen, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten ausschließlich mit cytoplasmatischen Domänen großer Glykosyltransferase-Aggregate wechselwirken. Auch hier wird eine Funktion bei der Retention von Golgi-Transferasen diskutiert (Yamaguchi und Fukuda, 1995).

Die beiden Mannan-Polymerasen I und II (M-Pol I und II) der Bäckerhefe setzen sich aus zwei (Mnn9p und Van1p) bzw. fünf (Anp1p, Hoc1p, Mnn9p, Mnn10p und Mnn11p) Proteinuntereinheiten zusammen (Jungmann und Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999).

Beide Enzymkomplexe sind an der Synthese der sogenannten "outer chain" N-gebundener Oligosaccharide im Golgi-Apparat beteiligt. Dabei überträgt M-Pol I die ersten ~10 Mannosylreste auf das Oligosaccharid und M-Pol II verlängert diese Kette auf ~50 Mannoseeinheiten (Munro, 2001). Interessant ist, dass beide Komplexe Mnn9p als Proteinuntereinheit nutzen. Im Fall von M-Pol I konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Mnn9p sowohl  $\alpha$ 1,2-, als auch  $\alpha$ 1,6-Mannosyltransferase-Aktivität besitzt, während die Funktion dieser Untereinheit in M-Pol II noch nicht charakterisiert ist (Stolz und Munro, 2002). Ein und dasselbe Protein kann also in verschiedenen Glykosyltransferase-Komplexe aktiv sein. Dies ermöglicht die Zusammensetzung von heterooligomeren Komplexen mit veränderter Aktivität und/oder Spezifität.

Diese Beispiele zeigen, dass Glykosyltransferase-Komplexe *in vivo* häufig gebildet werden. Die Protein/Protein Wechselwirkungen bieten dabei, je nach Enzymkomplex, unterschiedliche Vorteile. So werden u.a. die subzelluläre Lokalisation, Enzymaktivität oder Spezifität beeinflusst. Die Komplexbildung kann somit eine wichtige regulatorische Funktion für Glykosyltransferasen haben.

## 1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Die Bedeutung der Protein O-Mannosyltransferasen (Pmtps) für die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, wurde in den letzten Jahren in unserem Labor intensiv untersucht. Die O-Mannosylierung von Proteinen stellt eine essentielle Proteinmodifikation dar. Zudem ist ein Mindestmaß an Mannosyltransferase-Aktivität Voraussetzung für die strukturelle Integrität der Hefezelle. *PMT*-Homologe wurden in allen bisher charakterisierten Pilzen und tierischen Organismen (mit Ausnahme von *C. elegans*) identifiziert. In höheren Eukaryoten konnten Defekte in *PMT*-homologen Genen mit embryonalen Fehlentwicklungen und neuronalen Migrationsstörungen in Zusammenhang gebracht werden (Martin-Blanco und Garcia-Bellido, 1996; Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002). Pflanzen besitzen dagegen keine *PMT*-Homologen. Diese Tatsachen machen die Pmtps in zweifacher Hinsicht interessant. Zum einen stellt die PMT-Familie ein mögliches Ziel für die Entwicklung spezifischer Hemmstoffe dar, um beispielsweise phytopathogene Pilze wirksam zu bekämpfen. Zum anderen könnten spezielle Therapieansätze entwickelt werden, um Defekte in der O-Mannosylierung betroffener Patienten zu kompensieren. Dies setzt jedoch voraus, die Funktionsweise der Mannosyltransferasen im Detail zu verstehen. Bisher gibt es nur wenige Daten, die einen Einblick in Struktur und Arbeitsweise der Pmtps vermitteln. Diese Arbeit soll zum Verständnis der Funktionsweise von Protein O-Mannosyltransferasen aus *S. cerevisiae* beitragen.

- Die beiden Mannosyltransferasen der Bäckerhefe, Pmt1p und Pmt2p, bilden *in vivo* einen heteromeren Enzymkomplex (Gentzsch *et al.*, 1995). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die Komplexbildung für die Mannosyltransferasen Pmt1p – Pmt6p, ein generelles Merkmal ist. Dabei sollten mögliche Interaktionspartner der einzelnen Mannosyltransferasen identifiziert werden. Zusätzlich war von Interesse, welche molekularen Eigenschaften für die Protein/Protein Wechselwirkung notwendig sind, und ob hier ein allgemeines Grundprinzip für die PMT-Familienmitglieder vorliegt.
- Eine wichtige Grundlage für diese Arbeit war das von Strahl-Bolsinger und Scheinost entwickelte Membrantopologie-Modell für die Mannosyltransferase Pmt1p (siehe dazu

1.1.1.2) (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Basierend auf diesem Topologiemodell und Pmtp-Sequenzvergleichen, wurden strikt konservierte Aminosäuren identifiziert. Diese sollten in Pmt1p durch gezielte Mutagenese ausgetauscht werden. Ziel war es, Einblicke in die Funktionsweise der Pmtps zu erhalten und mögliche, für den Katalysemechanismus essentielle funktionelle Gruppen zu identifizieren.

- Darüber hinaus sollten Substratbindestellen in der Mannosyltransferase Pmt1p lokalisiert werden. Diese strukturellen Informationen stellen eine wichtige Grundlage dar, um gezielt Hemmstoffe entwickeln zu können, welche die Mannosyltransferase-Aktivität spezifisch inhibieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Organismen

##### *E. coli* Stämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
BL21	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-), dcm, gal, λ(DE3)</i>	Stratagene
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10] [F', proAB, lacI<sup>f</sup>ZΔM15]</i>	Promega
DH5α	<i>F<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup>, endA1, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, deoR, Φ80dlacZΔM15</i>	Hannahan, 1983
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>f</sup>ZΔM15]</i>	Promega
SURE <sup>®</sup> 2	<i>e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacI<sup>f</sup>ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene

##### Hefestämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
BY4742	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, -112, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
S288c	<i>MATα, SUC2, mal, mel, gal2, CUP1, flo1, flo8-1</i>	Goffeau, 1996
W303-1A	<i>MATα, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3,112, can1-100</i>	Thomas und Rothstein, 1989
SEY6210	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
SEY6211	<i>MATα, ade2-101, his3-Δ200, leu2-3, -112, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
<i>pmt1</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt1Δ::HIS3</i>	Lussier <i>et al.</i> , 1995
<i>pmt2</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt2Δ::LEU2</i>	Lussier <i>et al.</i> , 1995
<i>pmt3</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt3::HIS3</i>	Immervoll <i>et al.</i> , 1995
<i>pmt4</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt4::TRP1</i>	Immervoll <i>et al.</i> , 1995
<i>pmt5</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt5Δ::URA3</i>	Mrsa <i>et al.</i> , 1997
<i>pmt6</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt6Δ::LEU2</i>	Mrsa <i>et al.</i> , 1997
<i>pmt1pmt2</i>	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3, -112, lys2-801, trp1-Δ901, ura3-52, suc2-Δ9, pmt1Δ::HIS3, pmt2Δ::LEU2</i>	Lussier <i>et al.</i> , 1995



<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
<i>pmt1pmt3</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-3</i> , <i>-112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>suc2-<math>\Delta</math>9</i> , <i>pmt1<math>\Delta</math>::URA3</i> , <i>pmt3::HIS3</i>	Gentzsch und Tanner, 1996
CFY3	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-3</i> , <i>-112</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>suc2-<math>\Delta</math>9</i> , <i>pmt1::HIS3</i> , <i>pmt4::TRP1</i>	Frank, 2000
<i>pmt2pmt3</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-3</i> , <i>-112</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>suc2-<math>\Delta</math>9</i> , <i>pmt2<math>\Delta</math>::LEU2</i> , <i>pmt3::HIS3</i>	Gentzsch und Tanner, 1995
<i>pmt2pmt5</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-3</i> , <i>-112</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>suc2-<math>\Delta</math>9</i> , <i>pmt2<math>\Delta</math>::LEU2</i> , <i>pmt5<math>\Delta</math>::URA3</i>	T. Seidl unveröffentlicht

## 2.1.2 Plasmide

### 2.1.2.1 *E. coli* Vektoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
Bluescript KS	ori, bla, lacZ	Short <i>et al.</i> , 1988
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	ori, bla, lacZ	Promega
pGEX-2TK	ori, bla, lacI <sup>q</sup> , P <sub>tac</sub> , GST	Pharmacia Biotech
pUC18/19	ori, bla, lacZ $\alpha$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pFH1	<i>PMT1</i> PstI/EcoRI Fragment bp +597 bis +1360 in pUC19	diese Arbeit (siehe pVG35)*
pMT5	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 in pUC19	Strahl
GST-3N	<i>PMT3</i> PCR-Fragment bp –6 bis +235 in pGEX-2TK	Girrbach und Strahl, 2003
GST-4N	<i>PMT4</i> PCR-Fragment bp +1 bis +196 in pGEX-2TK	Girrbach und Strahl, 2003
GST-5N	<i>PMT5</i> PCR-Fragment bp +10 bis +367 in pGEX-2TK	Girrbach und Strahl, 2003
GST-6N	<i>PMT6</i> PCR-Fragment bp –3 bis +259 in pGEX-2TK	Girrbach und Strahl, 2003
pVG24	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 (pMT5) mit Mutation E426A	diese Arbeit (siehe pVG22)*
pVG25	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 (pMT5) mit Mutation D368A	diese Arbeit (siehe pVG23)*
pVG27	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 (pMT5) mit Mutation L479A	diese Arbeit (siehe pVG30)*
pVG33	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 (pMT5) mit Mutation L314A	diese Arbeit (siehe pVG32)*
pVG34	<i>PMT1</i> HindIII Fragment bp +814 bis +1593 (pMT5) mit Mutation L345A	diese Arbeit (siehe pVG31)*
pVG49	<i>PMT1</i> PCR-Produkt bp +97 bis +1326 mit Mutation E176R in pGEM T-easy	diese Arbeit (siehe pVG53)*
pVG50	<i>PMT1</i> PCR-Produkt bp +97 bis +1326 mit Mutation D189R in pGEM T-easy	diese Arbeit (siehe pVG52)*
pVG87	<i>PMT2</i> PCR-Produkt bp –147 bis +517 aus SEY6210 in pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Girrbach und Strahl, 2003
pVG88	<i>PMT2</i> PCR-Produkt bp –147 bis +517 aus W303-1A in pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Girrbach und Strahl, 2003

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
pVG89	<i>PMT2</i> PCR-Produkt bp –147 bis +517 aus BY4742 in pGEM®-T Easy	Girrbach und Strahl, 2003
pVG90	<i>PMT2</i> PCR-Produkt bp –147 bis +517 aus S288c in pGEM®-T Easy	Girrbach und Strahl, 2003
pVG92	<i>PMT1</i> <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI Fragment bp +597 bis +1360 (pFH1) mit Mutation H292A	diese Arbeit (siehe pVG35)*

\* Klonierung siehe 2.2.2.12

### 2.1.2.2 *E. coli* – *S. cerevisiae* Shuttle-Vektoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
YEp352	ori, bla, 2 $\mu$ , <i>URA3</i>	Hill <i>et al.</i> , 1986
pRS423	ori, bla, 2 $\mu$ , <i>HIS3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHakanMX	Klonierungsvektor mit einem 6-fachen HA-Epitop	Schermer, 2002
p9myc	Klonierungsvektor mit 9-fachem <i>c-myc</i> -Epitop	Jungmann und Munro, 1998
pJK4-B1	<i>PMT4</i> bp –675 bis +2289 mit 4x FLAG in pRS423	Girrbach und Strahl, 2003
pJK6	<i>PMT6</i> bp –1225 bis +3108 ( <i>Hind</i> III-Fragment) in YEp352 mit einem myc-Epitop am 3'-Ende	Klar, 2000
<i>PMT2</i> /YEp352	<i>PMT2</i> bp –538 bis +2409 ( <i>Hinc</i> II-Fragment) in YEp352	Lussier <i>et al.</i> , 1995
<i>PMT6</i> /YEp352	<i>PMT6</i> <i>Hind</i> III Fragment bp-1229 bis +3108 in YEp352	T. Seidl, unveröffentlicht
pSB53	<i>PMT1</i> bp –343 bis +2881 in YEp352	Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999
pSB56	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB63	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 732-817 in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB64	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 617-817 in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB101	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 76-124 ( $\Delta$ Loop1) in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB102	<i>PMT1</i> H411A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB104	<i>PMT1</i> N370A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB105	<i>PMT1</i> R64A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB108	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> L408A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB112	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> E78A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB113	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> D96A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB114	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> R138A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pSB115	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> L399A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ1	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> Q359A/Q360A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ2	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> Q493A/E495A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ3	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> L408A/H411A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ4	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> H346A/H348A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ5	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> W253A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ7	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> R398A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ8	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> R469A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pTZ9	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> H472A in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pVG9	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 161-211 ( $\Delta$ TM III-IV) in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pVG11	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 203-259 ( $\Delta$ Loop4) in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pVG13	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> $\Delta$ 304-531 ( $\Delta$ Loop5) in YEp352	Girrbach <i>et al.</i> , 2000
pVG19	<i>PMT1</i> <sup>HA</sup> R64A in YEp352	diese Arbeit*

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pVG22	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> E426A in YEp352	diese Arbeit*
pVG23	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> D368A in YEp352	diese Arbeit*
pVG30	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> L479A in YEp352	diese Arbeit*
pVG31	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> L345A in YEp352	diese Arbeit*
pVG32	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> L314A in YEp352	diese Arbeit*
pVG35	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> H292A in YEp352	diese Arbeit*
pVG36	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> R138K in YEp352	Girrbach und Strahl, 2003
pVG37	<i>PMT4<sup>FLAG</sup></i> Δ394-521 (ΔLoop5) in pRS423	Girrbach und Strahl, 2003
pVG38	<i>PMT6<sup>myc</sup></i> in YEp352	diese Arbeit*
pVG41	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> R138E <sup>HA</sup> in YEp352	Girrbach und Strahl, 2003
pVG45	<i>PMT4<sup>FLAG</sup></i> R142E in pRS423	Girrbach und Strahl, 2003
pVG51	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> R138E/D189R in YEp352	diese Arbeit*
pVG52	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> D189R in YEp352	diese Arbeit*
pVG53	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> E176R in YEp352	diese Arbeit*
pVG57	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> R138E/E176R in YEp352	diese Arbeit*
pVG64	<i>PMT1<sup>HA</sup></i> H411A in YEp352	diese Arbeit*
pVG76	<i>PMT2</i> bp -515 bis +2409 in YEp352	Girrbach und Strahl, 2003
pVG80	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> in YEp352	Girrbach und Strahl, 2003
pVG81	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> R79E in YEp352	diese Arbeit*
pVG82	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> R152E in YEp352	diese Arbeit*
pVG83	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> R198E in YEp352	diese Arbeit*
pVG84	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> E190R in YEp352	diese Arbeit*
pVG85	<i>PMT2<sup>HA</sup></i> D203E in YEp352	diese Arbeit*

\* Klonierung siehe 2.2.2.12

### 2.1.3 Oligonukleotide

Oligo	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
AL12	CAT TAG CTC GAG AAA GAA GCT TGC GCC ATC C	<i>PMT1</i> , bp +918 bis +900
195	GCA TCA CCG TCG AAT CC	<i>PMT1</i> , bp +1326 bis +1300
249	CAT GGC CTG ACA GCG TGG TGG TCG ACG GTG ACA GCT TTC CAT CTA C	<i>PMT1</i> , bp +206 bis +225 / +373 bis +392, mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
250	GTA GAT GGA AAG CTG TCA CCG TCG ACC ACC ACG CTG TCA GGC CAT G	<i>PMT1</i> , bp +392 bis +373 / +225 bis +206, mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
252	GCT GTC TTT ACA GCG GTC ATT GCA TTG CAT GGC TTG GCA TGG C	<i>PMT1 R64A</i> , bp + 179 bis +211
253	GCC ATG CCA AGC CAT GCA ATG CAA TGA CCG CTG TAA AGA CAG C	<i>PMT1 R64A</i> , bp +211 bis +179
254	GAC AGC GTG GTG TTT GAT GCA GTA CAT TTC GGT GGG TTT GCC	<i>PMT1 E78A</i> , bp +214 bis +255
255	GGC AAA CCC ACC GAA ATG TAC TGC ATC AAA CAC CAC GCT GTC	<i>PMT1 E78A</i> , bp +255 bis +214
256	CAT TAG GGG GAC TTA CTT CAT GGC TGT GCA TCC TCC TCT TGC	<i>PMT1 D96A</i> , bp +264 bis +305
257	GCA AGA GGA GGA TGC ACA GCC ATG AAG TAA GTC CCC CTA ATG	<i>PMT1 D96A</i> , bp +305 bis +264
258	CGA CGC CAT ACG TGT TGA TGG CAT TTT TCT CTG CTT CTT TGG G	<i>PMT1 R138A</i> , bp +392 bis +434

<i>Oligo</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>Bemerkung</i>
259	CCC AAA GAA GCA GAG AAA AAT GGC ATC AAC ACG TAT GGC GTC G	<i>PMT1 R138A</i> , bp +434 bis +392
260	CTG GTC TTC TTT TAT ATC GCC TTC CAA TCA TTA ACT TTG GAC GGG	<i>PMT1 H292A</i> , bp +856 bis +910
262	CTT TAT ATC CTC ACA TGG CTG CCA ATA ACG ATT GGT TGT TGG	<i>PMT1 D368A</i> , bp +1085 bis +1126
264	CTT TAT ATC CTC ACA TGG ATG CCG CTA ACG ATT GGT TGT TGG AAC	<i>PMT1 N370A</i> , bp +1085 bis +1129
265	GTT CCA ACA ACC AAT CGT TAG CGG CAT CCA TGT GAG GAT ATA AAG	<i>PMT1 N370A</i> , bp +1129 bis +1085
266	CTG TTA CAA GAT GTA GAG CAC ACT CTC ATG ACC ATA AGC CAC C	<i>PMT1 L408A</i> , bp +1205 bis +1247
267	GGT GGC TTA TGG TCA TGA GAG TGT GCT CTA CAT CTT GTA ACA G	<i>PMT1 L408A</i> , bp +1247 bis +1205
268	ACA AGA TGT AGA TTA CAC TCT GCT GAC CAT AAG CCA CCC GTT TC	<i>PMT1 H411A</i> , bp +1210 bis +1253
269	GAA ACG GGT GGC TTA TGG TCA GCA GAG TGT AAT CTA CAT CTT GT	<i>PMT1 H411A</i> , bp +1253 bis +1210
270	CGC CTG AAT TTA GAT CTA CAG CAA AGA ACA ATA AGA TCC CCC	<i>PMT1 L314A</i> , bp +920 bis +961
272	CTC TAC CAT GGG CGG TTA TGC GCA TTC TCA TTC ACA CAA TTA TCC	<i>PMT1 L345A</i> , bp +974 bis +1058
274	CCG ATG GTA CCA AGG TCA GAG CAT TCC ACA CTG TTA CAA GAT G	<i>PMT1 L399A</i> , bp +1175 bis +1217
275	CAT CTT GTA ACA GTG TGG AAT GCT CTG ACC TTG GTA CCA TCG G	<i>PMT1 L399A</i> , bp +1217 bis 1175
276	CAT GCT ATG ACA GGC TGT TAT GCG TTT TCC CAC GAA GTC AAG TTG	<i>PMT1 L479A</i> , bp +1414 bis +1458
vg1	CTC GAC ACG TGT CGA AGA AGA G	<i>PMT1</i> , bp -147 bis -126, mit <i>PmlI</i> -Schnittstelle
vg2	GGA CTT GTA AGC ATT GAG CGA GTT ACC AGA ATA ACG TAA AGT CAT GTA CAT C	<i>PMT1</i> , bp +657 bis +634 / <b>+480 bis +453</b>
vg3	GAT GTA CAT GAC TTT ACG TTA TTC TGG TAA CTC GCT CAA TGC TTA CAA G	<i>PMT1</i> , bp +453 bis +480 / <b>+634 bis +654</b>
vg4	GAT TTG ACT AAG TCG ACC AAG TCC ATC TTC	<i>PMT1</i> , bp +772 bis +801
vg5	GAA GAT GGA CTT GGT CGA CTT AGT CAA ATC	<i>PMT1</i> , bp +801 bis +772
vg6	GTC TAC TCT ACT AAG	<i>PMT1</i> , bp +598 bis +606 / <b>+778 bis +783</b>
vg7	TCG ACT TAG TAG AGT AGA CTG CA	<i>PMT1</i> , bp +785 bis +778 / <b>+606 bis +594</b>
vg8	CTA CGA CGC CAT ACG TGT TG	<i>PMT1</i> , bp +389 bis +408
vg15	TGG TTT ACC TAA CTG CC	<i>PMT1</i> , bp +1848 bis +1832
vg16	CCA TAC GTG TTG ATG AAA TTT TTC TCT GCT TCT TTG GG	<i>PMT1 R138K</i> , bp +397 bis +434
vg18	GCG ACT GGC AGA AGG CGG TTT CTT GTT ATG G	<i>PMT1 E426A</i> , bp +1262 bis +1292
vg23	ATG GCG TT	<i>PMT4</i> , bp +1175 bis +1179 / <b>+1564 bis +1566</b>
vg24	AAC GCC ATG GG	<i>PMT4</i> , bp +1566 bis +1564 / <b>+1179 bis +1562</b>
vg25	TTA TCC GCG GCA GGG GCG GGT GCA GAG	Amplifikation von 9x myc aus p9myc, <i>SacII</i> -Schnittstelle

<i>Oligo</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>Bemerkung</i>
vg26	CTA TCC GCG GAA TTC TTA CTA CTG CAG	Amplifikation von 9x myc aus p9myc, <i>SacII</i> -Schnittstelle
vg29	CGA CGC CAT ACG TGT TGA TGG AAT TTT TCT CTG CTT CTT TGG G	<i>PMT1 R138E</i> , bp +392 bis +434
vg30	GCT CCA TAT ATC GCG TAC GAA TCT TTC AAC GCG ATA TTG GG	<i>PMT4 R142E</i> , bp+406 bis +446
vg31	CTT TGA CGT TCA TCC C	<i>PMT4</i> , bp +291 bis +306
vg38	CTG CTT TGC CGT TCG AAA CTC GTA CGT C	<i>PMT1 E176R</i> , bp +513 bis +540
vg39	GAC GTA CGA GTT TCG AAC GGC AAA GCA G	<i>PMT1 E176R</i> , bp +540 bis +513
vg40	CGT TAC ATT CTG TTG CGC GCC CCA TTG ATG	<i>PMT1 D189R</i> , bp +550 bis +579
vg41	CAT CAA TGG GGC GCG CAA CAG AAT GTA ACG	<i>PMT1 D189R</i> , bp +579 bis +550
vg42	GAT CCG AGT GCC GAA TTG G	<i>PMT1</i> , bp +97 bis +115
vg43	GTT AAC TTC CAC GTT GCG GTT ATT CAC TAC TTA	<i>PMT1 Q629A</i> , bp +1870 bis +1902
vg44	TAA GTA GTG AAT AAC CGC AAC GTG GAA GTT AAC	<i>PMT1 Q629A</i> , bp +1902 bis +1870
vg45	CAA CGC ACC CGG CGA ATC	<i>PMT1</i> , bp +1134 bis +1151
vg46	GCT CTT GAA GAA ATA CAC AG	<i>PMT1</i> , bp +2109 bis +2090
vg47	GAA GAT CTG GGA TCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT G	Amplifikation des 4x <i>FLAG</i> aus pJK4-B1, mit <i>BglII</i> -Schnittstelle
vg48	GTT CGT CGA CGC TTA TTA CCG CGG CTT GTC ATC G	Amplifikation des 4x <i>FLAG</i> aus pJK4-B1, mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
vg53	CTG CAT TGG CGT TGT TCA CCG AGA TGT ACA AAA TCG GC	<i>PMT2 R79E<sup>HA</sup></i> , bp +215 bis +252 mit <i>MsII</i> -Schnittstelle
vg54	GCC GAT TTT GTA CAT CTC GGT GAA CAA CGC CAA TGC AG	<i>PMT2 R79E<sup>HA</sup></i> , bp +252 bis +215 mit <i>MsII</i> -Schnittstelle
vg55	GAT TAT GTT AAA ATG GAG CTC TTC AAC GCG TCA TTT TC	<i>PMT2 R152E<sup>HA</sup></i> , bp +439 bis +476 mit <i>SacI</i> -Schnittstelle
vg56	GAA AAT GAC GCG TTG AAG AGC TCC ATT TTA ACA TAA TC	<i>PMT2 R152E<sup>HA</sup></i> , bp +476 bis +439 mit <i>SacI</i> -Schnittstelle
vg57	CGT GTT GGT TTT GTT TCG AAA CTC GTA TAG TAC TT	<i>PMT2 E190R<sup>HA</sup></i> , bp +552 bis +586 mit <i>BspI19I</i> -Schnittstelle
vg58	AAG TAC TAT ACG AGT TTC GAA ACA AAA CCA ACA CG	<i>PMT2 E190R<sup>HA</sup></i> , bp +586 bis +552 mit <i>BspI19I</i> -Schnittstelle
vg59	CGT ATA GTA CTT TGG GCG AAT TCA TTC TTT TGG AC	<i>PMT2 R198E<sup>HA</sup></i> , bp +575 bis +609 mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
vg60	GTC CAA AAG AAT GAA TTC GCC CAA AGT ACT ATA CG	<i>PMT2 R198E<sup>HA</sup></i> , bp +609 bis +575 mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
vg61	GCA GGT TCA TTC TTT TGC GAT CGA TGC TAC TTT TCT TCA C	<i>PMT2 D203E<sup>HA</sup></i> , bp +590 bis +629 mit <i>PvuI</i> -Schnittstelle
vg62	GTG AAG AAA AGT AGC ATC GAT CGC AAA AGA ATG AAC CTG C	<i>PMT2 D203E<sup>HA</sup></i> , bp +629 bis +590 mit <i>PvuI</i> -Schnittstelle
vg63	CCG TTT CGT GTA CTG TTT ATT AAT AG	<i>PMT2</i> , bp -147 bis -121
vg64	CAA CTT CTC AGG GTC TTC ATC TCC	<i>PMT2</i> , bp +1399 bis +1422
vg65	GCC TGC CTT GTA TTT TGC ACT G	<i>PMT2</i> , bp +2037 bis +2058

<i>Oligo</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>Bemerkung</i>
vg66	GTA TGG GTA AAA GAT GCG GCC TGC TTC TTG CTT GTC GGC AAT	Megaprimer für <i>PMT2-6xHA</i> Fusion, pHakanMX 5'- <i>HA</i> -Sequenz / <i>PMT2</i> bp +2280 bis +2257
vg67	ATT GCC GAC AAG CAA GAA GCA GGC CGC ATC TTT TAC CCA TAC	Megaprimer für <i>PMT2-6xHA</i> Fusion, <i>PMT2</i> bp +2257 bis +2280 / pHakanMX 5'- <i>HA</i> -Sequenz
vg68	GCA GGT CGA CTA TGC CGG TAG AGG TGT GGT C	pHakanMX 3'-Terminatorsequenz mit <i>SalI</i> -Schnittstelle
vg69	TAG CTT TGG CAG TGA AGT AGG	<i>PMT2</i> , bp +507 bis + 487
vg70	CCT ACT TCA CTG CCA AAG CTA	<i>PMT2</i> , bp +487 bis + 507
vg71	CAA CGG TTC TTG GGA CTT CC	<i>PMT2</i> , bp +390 bis + 409

### 2.1.4 Medien

- *Medien für E. coli*

#### **LB-Medium** (Luria *et al.*, 1960)

1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 2 % Agar (für Platten), zur Selektion 100 µg/µl Ampicillin

#### **TSS-Medium**

85 % LB-Medium, 10 % PEG<sub>8000</sub>, 5 % DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **SOC-Medium** (Hanahan, 1983)

2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, zur Selektion 50 µg/µl Ampicillin

- *Medien für S. cerevisiae*

#### **YPD-Medium**

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose, 2 % Agar (für Platten)

#### **SD-Medium**

2 % Glukose, 0,7 % YNB ohne AS, 1,3 g/l AS Dropout, jew. 30 mg/l (nach Bedarf) Lys, Leu, His, Trp, Ura

### 2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alle eingesetzten Lösungsmittel und Chemikalien waren analysenrein und wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen Greiner, Laborcenter, Renner, Roth sowie Schleicher & Schuell.

#### **Folgende Firmen lieferten:**

**Applichem (Darmstadt):** IPTG

**Amersham Bioscience (Braunschweig):** ECL™ "Western Blotting Detection System", GDP-[<sup>14</sup>C]-Mannose, Hyperfilm MP, OCS Szintillationsmix

**Babco (Berkley, USA):** 16B12 anti-HA monoklonaler Antikörper, 9E10 (anti-*c-myc*) monoklonale Affinitätsmatrix, 9E10 (anti-*c-myc*) monoklonale Antikörper

**BioRad (München):** Ammoniumpersulfat, BioRad DC Protein Assay, TEMED  
**Biozym (Hameln):** "Low melting point" Sea Plaque Agarose  
**Braun (Melsungen):** Glasperlen Ø 0,45 mm  
**Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden):**  $\alpha$ 1-2,3,6-Mannosidase (MANaseII)  
**Difco Laboratories (Detroit):** Agar, Bakto-Hefeextrakt, Bakto-Pepton, Bakto-Trypton, Hefe-Stickstoffbasis (YNB) ohne Aminosäuren  
**Gibco BRL (Eggenstein):** DNA-Standard (kb-ladder) für Agarosegele  
**Kodak (Rochester, USA):** Biomax MR-Filme  
**Machery & Nagel (Düren):** Nucleobond AX Plasmid Reinigungssystem, Nucleo-Spin Extract 2in1 System  
**MBI-Fermentas (St. Leon):** Klenow DNA-Polymerase, dNTPs, Restriktionsenzyme und –puffer, X-Gal  
**Metabion (Martinsried):** Oligonukleotide  
**Millipore (Eschborn):** Sterilfilter  
**MWG-Biotech (Ebersberg):** Oligonukleotide  
**New England BioLabs (Schwalbach):** Deep Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> DNA Polymerase, Restriktionsenzyme und –puffer  
**Novex (Frankfurt):** "Mark12<sup>™</sup> Wide Range Protein Standard", "SeeBlue<sup>™</sup> PreStained Standard"  
**Pharmacia Biotech (Freiburg):** GSH-Sepharose 4B, T4 DNA-Ligase  
**Pierce (Rockford, USA):** N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS), N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat (SANPAH), Sulfosuccinimidyl2-(p-azidosalicylamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD)  
**Promega (Madison, USA):** "GeneEditor<sup>™</sup> *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System", pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor System, "Wizard<sup>™</sup> PCR Preps DNA Purification System"  
**Renner (Dannstadt-Schauernheim):** Sterilfilter  
**Roche (Penzberg):** Alkalische Phosphatase (CIP), anti-HA Affinitätsmatrix (Klon 3F10), Endoglykosidase H  
**Roth (Karlsruhe):** Acrylamid-Lösungen für SDS-PAGE, Ampicillin, APS, Glycerin, Kanülen, Natriumdodecylsulfat (SDS), Roti-Phenol<sup>®</sup>, Whatman-Papier, Szintillator Roti-Szint eco plus  
**Satorius (Göttingen):** Nitrozellulose Blotting Membranen, Sterilfilter  
**Schott (Mainz):** Violax-Röhrchen und Glaswaren  
**Seikagaku (Tokio, Japan):** Zymolyase (103.000 U)  
**Serva (Heidelberg):** BSA Fraktion V, Coomassie Blue G250, Coomassie Brilliant Blue R250, Polyethylenglycol 8000, Visking Dialyseschlauch  
**Siemens AG:** Entwicklerlösungen  
**Sigma (Deisenhofen):** Aminocaproat, Aminosäuren, anti-Biotin IgG Peroxidase Konjugat, anti-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinity Gel, anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat, anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat, Bistris, Bromphenolblau, Dithiothreitol, Dimethylsulfoxid, Glutathion, HA-Peptid, Heringsperma-DNA, HMW-Proteinstandard, Isoamylalkohol, Lithiumacetat, Methylenblau, Mineralöl, Nonidet P40, Polyethylenglycol 4000, Ponceau S, Proteaseinhibitoren, RNase, Tricin, Triton X-100, Tween 20, Xylencyanol  
**Stratagene (Heidelberg):** "QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit"  
**Takara (Shira, Japan):** Takara long range DNA Polymerase  
**Thermo BioSciences (Ulm):** Peptid NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)-COOH  
**USB (Bad Homburg):** Tris Base

### 2.1.6 Geräte

Beckman	Szintillationsgerät LS 6000SC, Ultrazentrifuge L8-M
BioRad	Gelapparatur Mini Protean II mit Blottingapparatur, Spannungsquelle PAC300
Biozym	PCR Cycler PTC-150
Branson	Sonifier B-12, Ultraschallbad B 220
Eppendorf	Thermoblock 5320, Thermomixer 5436, Zentrifuge 5414, 5417C und 5417R
Heidolph	Heizrührer MR 2002, Vortex REAX 2000
Heraeus	Erntezentrifuge 2141
Hettich	Mikroliterzentrifuge 2041, Rotina S Tischzentrifuge
Hoefer Scientific	Geltrockner SE 540
Memmert	Brutschränke
Mettler	Waagen H10 und P1210
MWG-Biotech	Video-Dokumentationssystem für DNA Agarosegele
New Brunswick Scientific	Luftschüttler G25 und Wasserbadschüttler G76
Novaspec	Fotometer
Pharmacia	Gene Quant II, Spannungsquelle GPS 200/400
Protec	Entwicklermaschine 45 compact
Sorvall	Zentrifugen Superspeed RC-2B und RC-5B
Thermo Hybaid	PCR-Express
WTW	pH-Meter 526
Zeiss	Binokular STEMI SV6

### 2.1.7 Internetdienste

BLAST-Suchprogramm	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/</a>
Carbohydrate-Active Enzymes	<a href="http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/">http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/</a>
ClustalW (Thompson <i>et al.</i> , 1994)	<a href="http://clustalW.genome.ad.jp/">http://clustalW.genome.ad.jp/</a>
ExPASy	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
JPRED	<a href="http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/">http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/</a>
MIPS	<a href="http://www.mips.biochem.mpg.de">http://www.mips.biochem.mpg.de</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
O-GLYCBASE	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/databases/OGLYCBASE">http://www.cbs.dtu.dk/databases/OGLYCBASE</a>
PFAM	<a href="http://www.sanger.ac.uk">http://www.sanger.ac.uk</a>
Proteome, Inc.	<a href="http://www.proteome.com/">http://www.proteome.com/</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de">http://smart.embl-heidelberg.de</a>
Stanford Genomic Resources	<a href="http://genome-www.stanford.edu/">http://genome-www.stanford.edu/</a>

### 2.1.8 Software

GCG Sequence Analysis Software Package  
 OptiQuant Phosphorimaging Software (Packard BioScience)



## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Anzuchtbedingungen und Anlegen von Dauerkulturen

- *Anzucht der E. coli Stämme*

Die Kulturen wurden in LB- oder LB<sub>Amp</sub>-Medium im Luftschüttler oder auf Agarplatte in temperaturkonstanten Inkubatoren über Nacht bei 37°C angezogen.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden über Nacht angezogene Kulturen abzentrifugiert und in frischem LB-Medium mit ~40 % Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

- *Anzucht der Hefestämme*

Die Stämme wurden im jeweiligen Medium i.d.R. über Nacht im Luftschüttler bei 30°C oder auf Agarplatten im temperaturkonstanten Inkubator über mehrere Tage angezogen. Das Wachstum temperatursensitiver Stämme erfolgte bei 25°C. Die Zelldichte in Flüssigkulturen wurde fotometrisch über die optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt.

Für das Anlegen von Hefe-Dauerkulturen wurden über Nacht angezogene Kulturen abzentrifugiert und in frischem YPD-Medium mit ~40 % Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen oder Klonierungen wurde entweder mit dem "Wizard™ Miniprep DNA Purification System" der Firma Promega oder durch alkalische Lyse nach der Methode von SeqLab-Laccone aus *E. coli* Zellen isoliert. Das Protokoll entsprach einer modifizierten Version der Birnboim und Doly Methode (1979): Eine 2 ml ÜN-Kultur wurde geerntet, die Zellen in 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM TrisHCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen und nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde mit 150 µl Neutralisationslösung gestoppt und der Reaktionsansatz für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Das Abzentrifugieren denaturierter Proteine erfolgte bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) für 2x 10 min. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 900 µl EtOH gefällt und bei 14.000 rpm, 4°C und > 15 min abzentrifugiert. Nach dem Waschen der DNA in 1 ml 70 % EtOH und anschließendem Trocknen wurde diese in 25 – 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Proteinverunreinigungen in DNA-Präparationen wurden durch Extraktion mit TE-gesättigtem Phenol (Roti-Phenol) beseitigt. Phenol, das sich partiell in der wässrigen Phase löst, wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit 1 Volumen Diethylether entfernt. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2 - 2,5 Volumeneinheiten EtOH und 30-minütiger Inkubation bei –20°C. Anschließend wurde die DNA wie oben abzentrifugiert, gewaschen und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Größere Mengen an Plasmid-DNA (ca. 100 – 500 µg) wurden mit Hilfe des Nucleobond AX Systems der Firma Machery & Nagel präpariert.

### **2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Plasmid-DNA wurde aus einer 10 ml ÜN-Kultur isoliert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 100 µl 1 M Sorbit, 20 mM EDTA pH 7,5, 2 mg/ml Zymolyase (103.000 U) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden 300 µl 1 M Sorbit, 20 mM EDTA pH 7,5 und 200 µl Zell-Lyse Lösung (Promega Wizard™ Miniprep DNA Purification System) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 65°C wurden 200 µl Neutralisationspuffer (aus "Promega Wizard™ Miniprep DNA Purification System") zugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im weiteren wurde nach dem Protokoll des "Wizard™ Miniprep DNA Purification System" von Promega verfahren. Zur Transformation in *E. coli* wurden bis zu 15 µl der DNA-Präparation eingesetzt.

### **2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae***

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen wurde nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) durchgeführt. 5 ml einer stationären ÜN-Hefekultur wurden geerntet und das Zellpellet in 200 µl 100 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und ca. 300 µl Glasperlen, wurden die Zellen durch 4-minütiges vortexen aufgebrochen. Anschließend wurden 200 µl TE pH 8 (10 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA) zugegeben, 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml EtOH und 10 sec abzentrifugieren. Die genomische DNA wurde mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O mit 100 µg/µl RNase A aufgenommen.

### **2.2.2.4 Klonierungstechniken**

Die Anleitungen zur Manipulation von DNA (Restriktionsendonukleasen, Klenow DNA-Polymerase, T4 DNA-Polymerase, T4 DNA-Ligase und alkalischer Phosphatase), sowie zur Herstellung analytischer und präparativer Agarosegele wurden aus der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

### **2.2.2.5 Gezielter Basenaustausch ("Site-directed Mutagenesis")**

Der gezielte Austausch einzelner Basen erfolgte mit dem "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) oder dem "GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System" (Promega). Die dafür verwendeten Oligonukleotide wurden nach Angaben der Hersteller ausgewählt und die Mutagenesereaktionen entsprechend durchgeführt. Des weiteren erfolgte ein gezielter Austausch mittels rekombinanter PCR-Mutagenese (Higuchi, 1990).

### **2.2.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Für die Herstellung präparativer Agarosegele wurde "low melting point"-Agarose verwendet. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte standardmäßig mit Hilfe des "Nucleo-Spin Extrakt 2in1" von Machery & Nagel.

### 2.2.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

- *Chemisch kompetente Zellen*

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Methode von Hanahan (1983) hergestellt, Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

- *Elektroporationskompetente Zellen*

*E. coli* Zellen wurden ÜN in 10 ml LB-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, morgens in 1 l frisches, auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtes LB-Medium überführt und solange inkubiert, bis eine Zelldichte von maximal  $0,5 - 1 \text{ OD}_{600}$  erreicht war. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgeerntet, 4x mit sterilem, eiskaltem Wasser und 1x mit 10 % Glycerin gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 2 bis 3 ml 10 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2.8 Transformation von *E. coli*

- *Transformation chemisch kompetenter Zellen*

Die Transformation wurde wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt.

- *Elektroporation*

Pro Transformationsansatz wurden ca.  $10^9$  Zellen und 10 – 200 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten der Firma EuroGentec (Belgien). Für die Transformation wurde an der Gene Pulser-Apparatur eine Kapazität von  $25 \mu\text{F}$ , ein Widerstand von  $200 \Omega$  und eine Spannung von 2,5 kV eingestellt. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 900  $\mu\text{l}$  vorgekühltem SOC Medium resuspendiert, 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt und auf  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platten ausplattiert.

### 2.2.2.9 Transformation von *S. cerevisiae*

Hefezellen wurde nach der Methode von Gietz *et al.* (1992) kompetent gemacht und transformiert. Je Transformation wurden bis zu 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt.

Lösungen: LiAc/TE (100 mM LiAc, 1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl pH 8), PEG/LiAc (40 % PEG<sub>4000</sub> in LiAc/TE). Bei der Transformation osmolabiler Stämme wurde allen Lösungen 1 M Sorbit zugesetzt. Die Transformation temperatursensitiver Stämme erfolgte ohne Hitzeschock; stattdessen wurden die Zellen 1 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.2.2.10 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma LeqLab (Göttingen) oder dem Sequenzierservice der Nat Fak IV der Universität Regensburg durchgeführt.

### 2.2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde die Taq-Polymerase (Qiagen), Deep Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> DNA Polymerase (BioLabs) oder die Takara "long range" (Takara) verwendet. Gewöhnlich wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden den Primern, dem

PCR-Produkt und den jeweils eingesetzten Polymerasen angepasst. Die Amplifikation erfolgte mit dem PCR-Express von Thermo Hybaid. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert.

### 2.2.2.12 Klonierung verschiedener Plasmide

- *pVG19 (PMT1<sup>HA</sup> R64A in YEp352)*

**Fusion des mutierten Enzyms Pmt1p R64A mit einem 6x HA-Epitop:** Die Plasmide pSB105 (*PMT1 R64A* in YEp352) und pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352) wurden mit den Restriktionsenzymen *CpoI* und *XhoI* präparativ verdaut. Von dem Restriktionsansatz pVG13 wurde ein 436 bp Fragment, das die DNA-Sequenz für das 6x HA-Epitop enthält, isoliert und in den aufgeschnittenen Vektor pSB105 ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG19 (*PMT1<sup>HA</sup> R64A* in YEp352).

- *pVG22 (PMT1<sup>HA</sup> E426A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese E426A:** Die Mutagenese wurde mit Hilfe des "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" Systems von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit dem Oligonukleotid vg18 an dem Plasmid pMT5 (*PMT1 HindIII* Fragment in pUC19). Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG24) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG24 wurde mit *HindIII* verdaut, das 780 bp Fragment isoliert und in pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352), das ebenfalls mit *HindIII* verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG22 (*PMT1<sup>HA</sup> E426A* in YEp352).

- *pVG23 (PMT1<sup>HA</sup> D368A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese D368A:** Die Mutagenese wurde mit Hilfe des "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" Systems von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit dem Oligonukleotid 262 an dem Plasmid pMT5 (*PMT1 HindIII* Fragment in pUC19). Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG25) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG25 wurde mit *HindIII* verdaut, das 780 bp Fragment isoliert und in pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352), das ebenfalls mit *HindIII* verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG23 (*PMT1<sup>HA</sup> D368A* in YEp352).

- *pVG30 (PMT1<sup>HA</sup> L479A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese L479A:** Die Mutagenese wurde mit Hilfe des "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" Systems von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit dem Oligonukleotid 276 an dem Plasmid pMT5 (*PMT1 HindIII* Fragment in pUC19). Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG27) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG27 wurde mit *HindIII* verdaut, das 780 bp Fragment isoliert und in pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352), das ebenfalls mit *HindIII* verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG30 (*PMT1<sup>HA</sup> L479A* in YEp352).

- *pVG31 (PMT1<sup>HA</sup> L345A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese L345A:** Die Mutagenese wurde mit Hilfe des "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" Systems von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit dem Oligonukleotid 272 an dem Plasmid pMT5 (*PMT1 HindIII* Fragment in pUC19). Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG34) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG34 wurde mit *HindIII* verdaut, das 780 bp Fragment isoliert und in pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352), das ebenfalls mit *HindIII* verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG31 (*PMT1<sup>HA</sup> L345A* in YEp352).

- *pVG32 (PMT1<sup>HA</sup> L314A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese L314A:** Die Mutagenese wurde mit Hilfe des "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" Systems von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit dem Oligonukleotid 270 an dem Plasmid pMT5 (*PMT1* *Hind*III Fragment in pUC19). Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG33) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG33 wurde mit *Hind*III verdaut, das 780 bp Fragment isoliert und in pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352), das ebenfalls mit *Hind*III verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG32 (*PMT1<sup>HA</sup> L314A* in YEp352).

- *pVG35 (PMT1<sup>HA</sup> H292A in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese H292A:** Für die Mutagenese mit dem "GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis" System von Promega wurde ein 753 bp *Pst*I/*Eco*RI Fragment aus pSB53 (*PMT1* in YEp352) isoliert und in pUC19 (*Pst*I/*Eco*RI) ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pFH1 wurde zusammen mit dem Oligonukleotid 260 in die Mutagenesereaktion eingesetzt. Eine Sequenzanalyse des mutagenisierten Plasmids (pVG92) bestätigte den korrekten Basenaustausch. pVG92 wurde mit *Kpn*I/*Pst*I verdaut, das 585bp Fragment isoliert und in pSB56 (*PMT1<sup>HA</sup>* in YEp352), das ebenfalls mit *Kpn*I/*Pst*I verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG35 (*PMT1<sup>HA</sup> H292A* in YEp352).

- *pVG38 (PMT6<sup>myc</sup> in YEp352)*

**Fusion des 9x *c-myc*-Epitops an PMT6:** In den Vektor pJK6 (Klar, 1999) wurden neun *c-myc*-Epitope eingeführt. Dazu wurde mit den Oligonukleotiden vg25 und vg26 die 9x myc-Sequenz über PCR aus dem Plasmid p9xMYC amplifiziert, das PCR-Produkt mit *Sac*II verdaut und in die *Sac*II-Schnittstelle des Vektors pJK6 kloniert. Daraus folgte Plasmid pVG38 (*PMT6<sup>myc</sup>* in YEp352).

- *pVG51 (PMT1<sup>HA</sup> R138E/D189R in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese R138E/D189R:** Ein 729 bp *Bsp*1407I/*Kpn*I Fragment wurde aus dem Plasmid pVG50 (pGEM T-easy mit PCR-Mutageneseprodukt D189R) isoliert und in pVG41 (*PMT1<sup>HA</sup> R138E* in YEp352), das ebenfalls mit *Bsp*1407I/*Kpn*I verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG51 (*PMT1<sup>HA</sup> R138E/D189R* in YEp352).

- *pVG52 (PMT1<sup>HA</sup> D189R in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese D189R:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg41/vg42 bzw. vg40/195 und dem Plasmid pSB56 (*PMT1<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (483 bp bzw. 767 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg42/195 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT1*-Sequenz bp +97 bis +1326). Das 1230 bp Produkt wurde in den Vektor pGEM T-easy kloniert und sequenziert. Das daraus resultierende Plasmid pVG50 wurde mit *Bsp*1407I/*Kpn*I verdaut, das 729 bp Fragment isoliert und in pSB56 (*PMT1<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG52 (*PMT1<sup>HA</sup> D189R* in YEp352).

- *pVG53 (PMT1<sup>HA</sup> E176R in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese E176R:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg39/vg42 bzw. vg38/195 und dem Plasmid pSB56 (*PMT1<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (444 bp bzw. 804 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg42/195 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT1*-Sequenz bp +97 bis +1326). Das 1230 bp Produkt wurde in den Vektor pGEM T-easy kloniert und sequenziert. Das daraus

resultierende Plasmid pVG49 wurde mit *Bsp*1407I/*Kpn*I verdaut, das 729 bp Fragment isoliert und in pSB56 (*PMT1<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG53 (*PMT1<sup>HA</sup> E176R* in YEp352).

- *pVG57 (PMT1<sup>HA</sup> R138E/E176R in YEp352)*

**PMT1 Mutagenese R138E/E176R:** Ein 729 bp *Bsp*1407I/*Kpn*I Fragment wurde aus dem Plasmid pVG53 (pGEM T-easy mit PCR-Mutageneseprodukt E176R) isoliert und in pVG41 (*PMT1<sup>HA</sup> R138E* in YEp352), das ebenfalls mit *Bsp*1407I/*Kpn*I verdaut wurde, ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG57 (*PMT1<sup>HA</sup> R138E/E176R* in YEp352).

- *pVG64 (PMT1<sup>HA</sup> H411A in YEp352)*

**Fusion des mutierten Enzyms Pmt1p H411A mit einem 6x HA-Epitop:** Die Plasmide pSB102 (*PMT1 H411A* in YEp352) und pVG13 (*PMT1<sup>HA</sup> Δ304-531* in YEp352) wurden mit den Restriktionsenzymen *Cpo*I und *Xho*I präparativ verdaut. Von dem Restriktionsansatz pVG13 wurde ein 436 bp Fragment, das die DNA-Sequenz für das 6x HA-Epitop enthält, isoliert und in den aufgeschnittenen Vektor pSB102 ligiert. Daraus folgte Plasmid pVG64 (*PMT1<sup>HA</sup> H411A* in YEp352).

- *pVG81 (PMT2<sup>HA</sup> R79E in YEp352)*

**PMT2 Mutagenese R79E:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg53/vg64 bzw. vg54/63 und dem Plasmid pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (399 bp bzw. 1207 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg63/64 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT2*-Sequenz bp -146 bis +1422). Das PCR-Produkt wurde mit *Mlu*I/*Xho*I verdaut und das 536 bp Fragment in pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Eine Sequenzanalyse des daraus resultierenden Plasmids pVG81 (*PMT2<sup>HA</sup> R79E* in YEp352) bestätigte den korrekten Basenaustausch.

- *pVG82 (PMT2<sup>HA</sup> R152E in YEp352)*

**PMT2 Mutagenese R152E:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg55/vg64 bzw. vg56/63 und dem Plasmid pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (983 bp bzw. 623 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg63/64 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT2*-Sequenz bp -146 bis +1422). Das PCR-Produkt wurde *Mlu*I/*Xho*I verdaut und das 536 bp Fragment in pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Eine Sequenzanalyse des daraus resultierenden Plasmids pVG82 (*PMT2<sup>HA</sup> R152E* in YEp352) bestätigte den korrekten Basenaustausch.

- *pVG83 (PMT2<sup>HA</sup> R198E in YEp352)*

**PMT2 Mutagenese R198E:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg59/vg64 bzw. vg60/63 und dem Plasmid pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (848 bp bzw. 756 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg63/64 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT2*-Sequenz bp -146 bis +1422). Das PCR-Produkt wurde *Mlu*I/*Mun*I verdaut und das 904 bp Fragment in pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Eine Sequenzanalyse des daraus resultierenden Plasmids pVG83 (*PMT2<sup>HA</sup> R198E* in YEp352) bestätigte den korrekten Basenaustausch.

- *pVG84 (PMT2<sup>HA</sup> E190R in YEp352)*

**PMT2 Mutagenese E190R:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg57/vg64 bzw. vg58/63 und dem Plasmid pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (871 bp bzw. 733 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer in die PCR eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg63/64 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT2*-Sequenz bp -146 bis +1422). Das PCR-Produkt wurde *MluI/MunI* verdaut und das 904 bp Fragment in pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Eine Sequenzanalyse des daraus resultierenden Plasmids pVG84 (*PMT2<sup>HA</sup> E190R* in YEp352) bestätigte den korrekten Basenaustausch.

- *pVG85 (PMT2<sup>HA</sup> D203R in YEp352)*

**PMT2 Mutagenese D203R:** In einem ersten PCR-Schritt wurden mit den Oligonukleotidpaaren vg61/vg64 bzw. vg62/63 und dem Plasmid pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352) als DNA-Vorlage, zwei DNA-Fragmente (833 bp bzw. 776 bp) amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion als Megaprimer eingesetzt und mit den beiden äußeren Primern vg63/64 nochmals amplifiziert (entspricht *PMT2*-Sequenz bp -146 bis +1422). Das PCR-Produkt wurde *MluI/MunI* verdaut und das 904 bp Fragment in pVG80 (*PMT2<sup>HA</sup>* in YEp352), das mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Eine Sequenzanalyse des daraus resultierenden Plasmids pVG85 (*PMT2<sup>HA</sup> D203R* in YEp352) bestätigte den korrekten Basenaustausch.

- *pVG87 (PMT2 Teilsequenz in pGEM T-easy)*

**DNA-Sequenzanalyse des *PMT2* ORF:** Für die Amplifikation eines 664 bp Fragments mit den Oligonukleotiden vg63 und vg64 wurde die genomische DNA des Hefestammes SEY6210 als Vorlage eingesetzt. Das PCR-Produkt (*PMT2*-Sequenz von bp -147 bis +517) wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert.

- *pVG88 (PMT2 Teilsequenz in pGEM T-easy)*

**DNA-Sequenzanalyse des *PMT2* ORF:** Für die Amplifikation eines 664 bp Fragments mit den Oligonukleotiden vg63 und vg64 wurde die genomische DNA des Hefestammes W303-1A als Vorlage eingesetzt. Das PCR-Produkt (*PMT2*-Sequenz von bp -147 bis +517) wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert.

- *pVG89 (PMT2 Teilsequenz in pGEM T-easy)*

**DNA-Sequenzanalyse des *PMT2* ORF:** Für die Amplifikation eines 664 bp Fragments mit den Oligonukleotiden vg63 und vg64 wurde die genomische DNA des Hefestammes BY4742 als Vorlage eingesetzt. Das PCR-Produkt (*PMT2*-Sequenz von bp -147 bis +517) wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert.

- *pVG90 (PMT2 Teilsequenz in pGEM T-easy)*

**DNA-Sequenzanalyse des *PMT2* ORF:** Für die Amplifikation eines 664 bp Fragments mit den Oligonukleotiden vg63 und vg64 wurde die genomische DNA des Hefestammes S288c als Vorlage eingesetzt. Das PCR-Produkt (*PMT2*-Sequenz von bp -147 bis +517) wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ligiert.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BioRad DC Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Eichung des Tests wurden BSA-Mengen von 0 – 20 µg eingesetzt.

### 2.2.3.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

- *SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über 6 – 10 % SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli und King, 1970). Die Proben wurden je nach Volumen mit 2 – 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V, bis zum Auslaufen des Blaumarkers.

- *"Blue-native Polyacrylamid Gelelektrophorese" (BN-PAGE)*

Die Auftrennung nativer Proteinkomplexe erfolgte über ein Gradientengel von 4 – 13 %, mit einem 4 % Sammelgel, nach der Methode von Schagger und von Jagow (1991). Sowohl das Acrylamidgel, als auch der Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM Bistris, 0,02 % Coomassie Blue G) enthielten zusätzlich 0,02 % Nonidet P40 (NP40). Die Elektrophorese wurde nach 1 h bei 80 V, 4°C, gestoppt und der Kathodenpuffer gegen einen Kathodenpuffer ohne Coomassie Blue G (50 mM Tricin, 15 mM Bistris) ausgetauscht. Die Elektrophorese wurde für weitere ~6 h bei 100 V und 4°C fortgesetzt.

- *Anfärben von Proteinbanden*

Die Färbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, mit Coomassie Brilliant Blue R250 durchgeführt. Das Entfärben erfolgte in einer 10 % Essigsäurelösung. Die Gele wurden anschließend auf dem Gelrockner getrocknet.

- *Western Blot Analyse*

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE bzw. BN-PAGE wurden diese elektrophoretisch 3 h bei 150 mA auf Nitrozellulose überführt (Dunn, 1986) und anschließend reversibel mit Ponceau S (Sigma) gefärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran ~30 min in einer TBS/T (140 mM NaCl, 20 mM TrisHCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,1 % Tween 20) Blockierlösung mit 6 % Magermilchpulver oder 1 % BSA, geschwenkt. Anschließend wurde die Blockierlösung mit TBS/T 1:1 verdünnt, der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung zugegeben (siehe Tabelle 2-1) und die Membran damit überschichtet. Nach der Inkubation für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C wurde der Blot 3x für 10 min in TBS/T gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper gemäß Herstellerangaben inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen (nach Verwendung des anti-Biotin Antikörpers wurde der Blot 1 – 2 h gewaschen). Die Detektion der gebundenen Peroxidase-Konjugate erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blot Detektions-Systems (Amersham Bioscience) nach Vorschrift des Herstellers.

<i>Antikörper gegen</i>	<i>Verdünnung (1:x)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Aga2p	1000	C. Cappellaro
Biotin	2000	Peroxidase Konjugat, Sigma
<i>c-myc</i> -Epitop (EQKLISEEDL)	5000	Babco



<i>Antikörper gegen</i>	<i>Verdünnung (1:x)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Cpy1p	1000	L. Lehle
Cts1p	2500	T. Immervoll
FLAG-Epitop (DYKDDDDK)	5000	M2 monoklonaler AK, Sigma
Gas1p	2500	L. Popolo
HA-Epitop (YPYDVPDYA)	8000	16B12 monoklonaler AK, Babco
Pir2p (Hsp150p)	5000	M. Makarow
Pmt1p	2000	S. Strahl
Pmt2p	1000	M Gentzsch
Pmt3p	500	S. Strahl
Pmt4p	2500	S. Strahl
Pmt5p	2500	S. Strahl
Pmt6p	2500	S. Strahl
Wbp1p	2000	L. Lehle

Tabelle 2-1: Verdünnungen von Antikörpern

### 2.2.3.3 Zellwand- und Membranpräparation aus Hefe

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. 25 OD<sub>600</sub> einer logarithmisch wachsenden Zellkultur wurden geerntet, in ~10 ml Membranpuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und in 100 µl Membranpuffer mit Proteaseinhibitoren (20 µg/ml Antipain, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF, 0,25 mM TLCK, 50 µg/ml TPCK) resuspendiert. Der Glasperlenaufschluß erfolgte im RiboLyser für 2x 15 sec, und 1 min Kühlung, auf Eis. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von den Glasperlen getrennt und die Zellwände 20 sec bei 14.000 rpm pelletiert. Die Membranen wurden mind. 30 min bei 48.000 g und 4°C (SS34-Rotor) abzentrifugiert. Die Membranen wurden in 250 µl Membranpuffer incl. Proteaseinhibitoren und 10 % Glycerin aufgenommen (1 OD<sub>600</sub> / 10 µl) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.3.4 Solubilisierung von Hefe-Membranproteinen

- *DOC-Extrakte*

Von einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden 25 OD<sub>600</sub> geerntet und wie oben beschrieben Membranen präpariert. Das Membranpellet wurde in 500 µl DOC-Puffer (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,35 % Na-Deoxycholat, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) mit Proteaseinhibitoren (20 µg/ml Antipain, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF, 0,25 mM TLCK, 50 µg/ml TPCK) resuspendiert und 15 min auf dem Eppendorfschüttler bei 4°C geschüttelt. Nicht solubilisiertes Material wurde bei 48.000 g, 30 min und 4°C (SS34-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand (= DOC-Extrakt) wurde direkt in Co-Immunpräzipitationen eingesetzt.

- *Triton-Extrakte*

Alle Arbeitsschritte wie bei DOC-Extrakten. Ausnahme: das Membranpellet wurde hier in 500 µl Triton-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) incl. Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die Triton-Extrakte wurden in Aliquots mit jeweils > 700 µg Gesamtprotein in flüssigem Stickstoff gelagert oder direkt in Co-Immunpräzipitationen eingesetzt.

- *NP40-Extrakte*

Von einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden 250 OD<sub>600</sub> geerntet und Membranen mit einem modifizierten Puffer A (50 mM TrisHCl pH 7,5, 15 % Glycerin und Proteaseinhibitoren) isoliert. Der Glasperlenaufschluß erfolgte in 50 ml Falcon durch 6x 1 min vortexen mit jeweils 1 min Kühlung auf Eis. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben. Das Membranpellet wurde in 1 ml NP40-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 750 mM Aminocaproat, 0,5 % Nonidet P40, 15 % Glycerin) und Proteaseinhibitoren resuspendiert und 20 min bei RT auf dem Vibrax-Schüttler inkubiert. Nicht solubilisiertes Material wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g, 1 h und 4°C (Beckman, Ti70-Rotor) abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben bestimmt und 20 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation solubilisierter Membranproteine

Für die Immunpräzipitation von Pmt3-6p und Pmt6p<sup>myc</sup> wurden DOC-Extrakte (siehe 2.2.3.4) hergestellt. Um Pmt3-6p präzipitieren zu können, wurden zunächst polyklonale anti-Pmt3-6p Antikörper nach dem Protokoll von Harlow und Lane (1988) an Protein A-Sepharose (anti-Pmt3-6p Affinitätsmatrix), gekoppelt. Nach Zugabe von 300 µl DOC-Extrakt zu 20 – 50 µl gekoppelten anti-Pmt3-6p Antikörpern bzw. zu 30 µl einer anti-*c-myc* Affinitätsmatrix (9E10, von Babco) wurden die Ansätze für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate 4x mit 1 ml DOC-Puffer (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,35 % Na-Deoxycholat, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) und 1x mit TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen. Die Immunpräzipitate wurden dann in 20 µl 3x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) resuspendiert und über Western Blot analysiert.

Zur Immunpräzipitation von Pmt1p<sup>HA</sup>, Pmt2p<sup>HA</sup> und Pmt4p<sup>FLAG</sup> wurden von entsprechenden Hefestämmen Triton-Extrakte präpariert (siehe 2.2.3.4). Die Präzipitation von Pmt1p<sup>HA</sup> und Pmt2p<sup>HA</sup> erfolgte durch Zugabe von 15 µl Protein A-Sepharose gekoppelter monoklonaler anti-HA Antikörper (Klon 3F10, anti-HA Affinitätsmatrix von Roche) zu 400 µl der entsprechenden Triton-Extrakte. Für die Präzipitation von Pmt4p<sup>FLAG</sup> wurden 30 µl des anti-FLAG M2 Affinitätsgels (Sigma) und 400 µl Triton-Extrakt verwendet. Alle Ansätze wurden bei 4°C für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate 4x mit 1 ml Triton-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) und 1x mit TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen und wie oben analysiert.

### 2.2.3.6 Fotoaffinitäts-Markierung

Der Umgang mit den fotoaktivierbaren, heterobifunktionalen Quervernetzern N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS), N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoat (SANPAH) und Sulfosuccinimidyl2-(*p*-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD) erfolgte in abgedunkelten Räumen. Alle Quervernetzer wurden für die einzelnen Experimente immer neu eingewogen und nach Angaben des Herstellers (Pierce) in dem organischen Lösungsmittel DMSO gelöst. Für die Kopplung der fotoaktivierbaren Gruppen an das Peptid NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)-COOH wurden pro Reaktionsansatz 1 µl 200 mM ANB-NOS, SANPAH bzw. SASD und 2 µl 50 mM NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)-COOH (ebenfalls in DMSO gelöst) in einem Reaktionsgefäß gemischt und 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Für Negativkontrollen wurde jeweils 1 µl einer 200 mM Stammlösung des entsprechenden Quervernetzers und 2 µl DMSO verwendet.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Triton-Extrakte (siehe 2.2.3.4) wurden auf Eis aufgetaut und eine Immunpräzipitation, wie unter 2.2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Präzipitate 4x mit Triton-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) und 1x mit TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM

EDTA) gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vollständig abgenommen und das Präzipitat in 27 µl des FA-Puffers (120 mM TrisHCl pH 7,5, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 % Triton X-100, 0,3 mM HA-Peptid) resuspendiert. Durch Zugabe des an den Quervernetzer gekoppelten Peptids (z.B. ANB-NOS-YATAVK(Biotin)-COOH) zum Präzipitat und anschließender Belichtung der Ansätze mit UV-Licht (312 nm) für 10 min bei RT, erfolgte die Fotoaktivierung und Bindung des Peptids an spezifische Proteine. Nach der Reaktion wurde jeweils 5 µl 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) zugegeben, die Proteine über ein 8 % SDS-Gel aufgetrennt und über Western Blot analysiert.

#### **2.2.3.7 "Blue-native Polyacrylamid Gelelektrophorese" (BN-PAGE)**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten NP40-Extrakte (siehe 2.2.3.4) wurden auf Eis aufgetaut. 40 µg Gesamtprotein wurde direkt vor der Elektrophorese mit Coomassie Blue G (Serva; gelöst in 500 mM Aminocaproat) aus einer 5 %-igen Lösung gemischt und so ein Detergenz/Coomassie Verhältnis von 4:1 eingestellt. Die Proben wurden direkt auf das Polyacrylamid-Gradientengel geladen und die Elektrophorese mit anschließendem Blotten der Proteine auf Nitrozellulose, wie unter 2.2.3.2 (BN-PAGE) beschrieben, durchgeführt.

#### **2.2.3.8 Chemische Quervernetzung von Membranproteinen**

Von einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden 50 OD<sub>600</sub> geerntet und mit 20 ml OPA-Puffer gewaschen (50 mM Borsäure/di-Natrium-Tetraborat pH 8) und in 200 µl OPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (20 µg/ml Antipain, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF, 0,25 mM TLCK, 50 µg/ml TPCK) resuspendiert. Die Membranpräparation erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben. Das Membranpellet wurde in 20 ml OPA-Puffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen und für 30 min bei 48.000 g und 4°C zentrifugiert (SS34-Rotor). Anschließend wurden die Membranen in 500 µl OPA-Puffer resuspendiert. Die Quervernetzung der Membranproteine erfolgte nach den Angaben von Miao *et al.* (1998) durch Zugabe von *o*-Phthaldialdehyd (OPA, Sigma) in einer Endkonzentration von 25 – 200 µM zu 100 µl der Membransuspension. Die Ansätze wurden 30 min im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M TrisHCl pH 6,8 wurden die Reaktionen gestoppt. 1/10 des Probenvolumens wurde auf ein 8 % SDS-Gel geladen und über Western Blot analysiert.

#### **2.2.3.9 Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation**

Von einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden 250 OD<sub>600</sub> geerntet, die Zelle in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 10 ml eines 100 mM TrisHCl pH 9,4, 10 mM DTT Puffers resuspendiert und 15 min bei 30°C leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ml Spheroplasten-Puffer (20 mM TrisHCl pH 7,5, 1,2 M Sorbit) gewaschen, in 10 ml Spheroplasten-Puffer mit 8 mg Zymolyase (103.000 U) resuspendiert und die Hefezellwände 1,5 h bei 30°C unter leichtem Schütteln verdaut. Der Verdau der Zellwand wurde unter dem Mikroskop durch Zugabe von H<sub>2</sub>O zu den Zellen überprüft (Platzen der Spheroplasten). Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Spheroplasten-Puffer vorsichtig gewaschen und in 1 ml Lyse-Puffer (20 mM TrisHCl pH 7,5, 1,2 M Sorbit, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µg/ml Antipain, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF, 0,25 mM TLCK, 50 µg/ml TPCK) resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte auf Eis in einem 5 ml Zell-Homogenisator, durch ~8- bis 10-maliges homogenisieren der Zellsuspension. Zelltrümmer wurden dann durch 3 Zentrifugationsschritte bei 500 g (4°C) entfernt und der Überstand auf einen 11-stufigen Saccharose Dichtegradienten (18 – 60 % Saccharose gelöst in 10 mM TrisHCl pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) geladen. Die subzelluläre Fraktionierung wurde nach der Methode von Schröder *et al.* (1995), mit folgenden Änderungen durchgeführt: die Gradienten wurden für 2,5 h in einem

TST41.14-Rotor (Kontron Instruments) bei 35.700 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und davon jeweils 30 µl Aliquots über Western Blot analysiert.

### 2.2.3.10 Extraktion von Zellwandproteinen

- *Aga2p*

Die Isolierung der  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheit Aga2p erfolgte nach Watzele *et al.* (1988). Von einer logarithmisch wachsenden Hefezellkultur mit dem Paarungstyp *MATa* wurden 2 OD<sub>600</sub> geerntet und in 2 ml frisches YPD-Medium aufgenommen. Die Zellkultur wurde durch Zugabe von 10 µg/ml  $\alpha$ -Faktor für 2 h bei 30°C induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in 1 ml Membranpuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und in 30 µl 50 mM TrisHCl pH 8,5, 2 mM DTT für 1 h bei 4°C geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde der Überstand (DTT-Extrakt) entweder in 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) resuspendiert und über ein 17,5 % SDS-Gel aufgetrennt oder wie folgt dialysiert. Der Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 3,5 kDa wurde mit dem DTT-Extrakt befüllt und für ~ 3 h bei 4°C und anschließend ÜN gegen H<sub>2</sub>O dialysiert. Die Proben wurden dann lyophilisiert.

- *Cts1p (Chitinase)*

Die Chitinase (Cts1p) wurde direkt in der Zellwandfraktion über Western Blot Analyse nachgewiesen. Hierzu wurden präparierte Zellwände (siehe 2.2.3.3) 1x in 1 ml TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen, das Pellet in 1x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) aufgenommen, 2 min bei 95°C inkubiert und 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Äquivalent von 0,25 – 1 OD<sub>600</sub> über ein 6 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

- *Pir2p (Hsp150p)*

Die Isolierung von Pir2p aus dem Kulturmedium erfolgte nach Gentzsch und Tanner (1997). Die Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden geerntet und in frischem YPD-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 100 resuspendiert. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in ein 15 ml Falcon überführt und 60 – 90 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert und 10 µl des Medienüberstands nach Inkubation mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) für 5 min bei 95°C über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### 2.2.3.11 Glykosidase-Verdau

- *Endoglykosidase H (EndoH)*

Die Abspaltung N-glykosidisch gebundener Zucker von Membranproteinen erfolgte mit Endoglykosidase H (EndoH). Hierzu wurden 10 µl einer Membransuspension (siehe 2.2.3.3) mit einer Proteinkonzentration von 2,5 µg/µl in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 10 µl 2x EndoH-Puffer (100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 5,5, 0,2 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,04 % SDS) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 4°C geschüttelt. Nach Zugabe von 0,5 Einheiten EndoH wurden die Proben 1 h bei 30°C inkubiert. Die Kontrollansätze ohne EndoH wurden gleich behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) gestoppt und die Proteine über ein 8 % SDS-Gel aufgetrennt.

- *$\alpha$ 1-2,3,6-Mannosidase (MANaseII)*

Die Abspaltung O-gebundener Mannosen von Pmt1p<sup>HA</sup> Mutanten erfolgte mit MANaseII nach dem Protokoll von Snaith (1975). Hierzu wurden Triton-Extrakte (2.2.3.4) hergestellt und Pmt1p<sup>HA</sup> mit Hilfe einer anti-HA Affinitätsmatrix präzipitiert (2.2.3.5). Das Präzipitat wurde anschließend in 20  $\mu$ l MANaseII-Puffer (125 mM Essigsäure/NaOH pH 5, 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,01 % BSA) resuspendiert und 0,05 Einheiten der MANaseII zugegeben. Die Ansätze wurden 3 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mit 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) gestoppt und auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt.

### 2.2.3.12 Pmtp in vitro Enzymtests I und II

- *Herstellung von Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man*

Die im Triton-Extrakt von Hefemembranen enthaltene enzymatische GDP-Man:Dol-P Mannosyltransferase (Dpmlp) Aktivität, wurde zur Synthese der Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man genutzt. Die Isolierung der Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man erfolgte nach Sharma *et al.* (1974). Ein Reaktionsansatz mit Gesamtvolumen von 725  $\mu$ l enthielt: 7 mM TrisHCl pH 7,5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 28 mM Cystein, 0,25 % Triton X-100, 33,5  $\mu$ g Dol-P (Sigma D-7014), 0,5  $\mu$ Ci GDP-[<sup>14</sup>C]-Man (303 Ci/mol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125  $\mu$ l Triton-Extrakt gestartet.

- *in vitro Enzymtest I*

Die Bestimmung der Enzymaktivität von Pmt1p-Pmt2p erfolgte nach Strahl-Bolsinger und Tanner (1991). Ein Test mit Gesamtvolumen von 70  $\mu$ l enthielt: 7 mM TrisHCl pH 7,5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM Acetyl-YATAV-NH<sub>2</sub>, 0,14 % Triton X-100. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 15 bzw. 30  $\mu$ g Membranprotein gestartet, 30 min bei 30°C inkubiert und mit 1 ml Chloroform/Methanol 3:2 gestoppt. Nach Zugabe von 0,2 ml H<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation bei 11.000 rpm für 3 min, wurden von der wässrigen Phase 450  $\mu$ l abgenommen, mit 5 ml Szintcocktail gemischt und die Radioaktivität im Szintillator gemessen.

- *in vitro Enzymtest II*

Die Bestimmung der Restaktivität in *pmt*-Mutanten erfolgte nach Lussier *et al.* (1995b). Pro Ansatz wurden 0,04  $\mu$ Ci Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man in ein Violax-Röhrchen mit N<sub>2</sub> eingeblasen. Ein Test mit Gesamtvolumen von 140  $\mu$ l enthielt: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM Acetyl-YATAV-NH<sub>2</sub>, 0,14 % Triton X-100. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 250  $\mu$ g Membranprotein gestartet, 30 min bei RT inkubiert und mit 2 ml Chloroform/Methanol 3:2 gestoppt. Nach Zugabe von 0,5 ml H<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation in der Hettich Tischzentrifuge für 5 min, wurde von der wässrigen Phase 0,5 ml abgenommen, mit 5 ml Szintcocktail gemischt und die Radioaktivität im Szintillator gemessen.

- *Bestimmung der in vitro Mannosyltransferase-Aktivität in Immunpräzipitaten*

Die Bestimmung der Pmt1p-Pmt2p Enzymaktivität erfolgte nach Strahl-Bolsinger und Tanner (1991). Dazu wurden pro Ansatz 0,02  $\mu$ Ci Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit N<sub>2</sub> eingeblasen. Die Immunpräzipitation erfolgte wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Die Präzipitate wurden 4x mit 1 ml Triton-Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin) und 1x mit TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen und der Überstand vollständig mit einer Hamilton-Spritze abgenommen. Anschließend wurden die Präzipitate in 65  $\mu$ l einer 7,7 mM TrisHCl pH 7,5, 7,7 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,15 % Triton X-100 Lösung resuspendiert und in die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 0,02  $\mu$ Ci Dol-P-[<sup>14</sup>C]-Man überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5  $\mu$ l 50 mM Acetyl-YATAV-NH<sub>2</sub> (Endkonzentration 3,5 mM) gestartet, 30 min bei 30°C inkubiert und mit 1 ml

Chloroform/Methanol 3:2 gestoppt. Nach Zugabe von 0,2 ml H<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation bei 11.000 rpm für 3 min, wurden von der wässrigen Phase 450 µl abgenommen, mit 5 ml Szintcocktail gemischt und die Radioaktivität im Szintillator gemessen.

### 2.2.3.13 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Affinitätsreinigung der anti-Pmt3-6p Antikörper mussten zunächst die entsprechenden GST (Gluthation S-Transferase)-Fusionsproteine (siehe Tabelle) exprimiert und gereinigt werden. Hierzu wurden die Plasmid-tragenden *E. coli* BL21 Stämme, ÜN in 10 ml LB<sub>amp</sub> bei 37°C angezogen, morgens in 1 l frisches LB<sub>amp</sub> überführt und solange inkubiert, bis eine Zelldichte von 0,25 – 0,5 OD<sub>600</sub> erreicht war. Die Induktion der Genexpression von GST-Fusionsproteinen erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach 2,5 h bei 37°C wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt, die Zellen geerntet, mit 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in 1,5 ml TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA und 1 mM PMSF) resuspendiert und anschließend bei 4°C aufgetaut. Der vollständige Zellaufschluss erfolgte durch die Behandlung mit Ultraschall (2 – 3x für 10 sec, auf Eis). Nach Zugabe von 1 % Triton X-100 wurden die Ansätze für 30 min bei RT im Eppendorfschüttler inkubiert und im Anschluss die unlöslichen Bestandteile und Zelltrümmer durch 5 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C von der löslichen Fraktion getrennt. Die GST-Fusionsproteine wurden aus dem Überstand mit 150 µl einer GSH-Sepharosematrix (50 % Suspension) präzipitiert. Die Ansätze wurden hierzu 10 min bei RT inkubiert, die GSH-Sepharose kurz abzentrifugiert und 1x mit 1,5 ml TBS und 1 % Triton X-100 und 4x mit 1,5 ml TBS gewaschen. Das Präzipitat wurde anschließend in 3x SDS-Probenpuffer (Laemmli und King, 1970) resuspendiert.

Plasmid	Expression von
GST-3N	Pmt3p: Met1 – Arg78
GST-4N	Pmt4p: Met1 – Ala65
GST-5N	Pmt5p: Glu4 – Thr121
GST-6N	Pmt6p: Met1 – Gln86

### 2.2.3.14 Affinitätsreinigung der anti-Pmt3-6p Antikörper

5 – 10 µl Aliquots der angereicherten GST-Fusionsproteine (2.2.3.13) wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Anfärben der Membran mit Ponceau S konnte die stark überexprimierte Fusionsproteinbande ausgeschnitten werden. Diese mit GST-Pmtp-Epitopen dekorierten Membranstreifen wurde mit den jeweiligen anti-Pmt3-6p Immunseren inkubiert. Die Reinigung der adsorbierten polyklonalen anti-Pmtp Antikörper erfolgte nach dem Protokoll von Olmsted (1981). Die Immunisierung der Kaninchen wurde vom Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt.

### 2.2.3.15 Kopplung polyklonaler Antikörper an Protein A-Sepharose

Die Kopplung der affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper an Protein A-Sepharose erfolgte nach dem Protokoll von Harlow und Lane (1988). Die Sepharose-gekoppelten Antikörper wurden in TBS (20 mM TrisHCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,01 % Timerosal®) bei 4°C gelagert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Pmtp-KOMPLEXBILDUNG IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

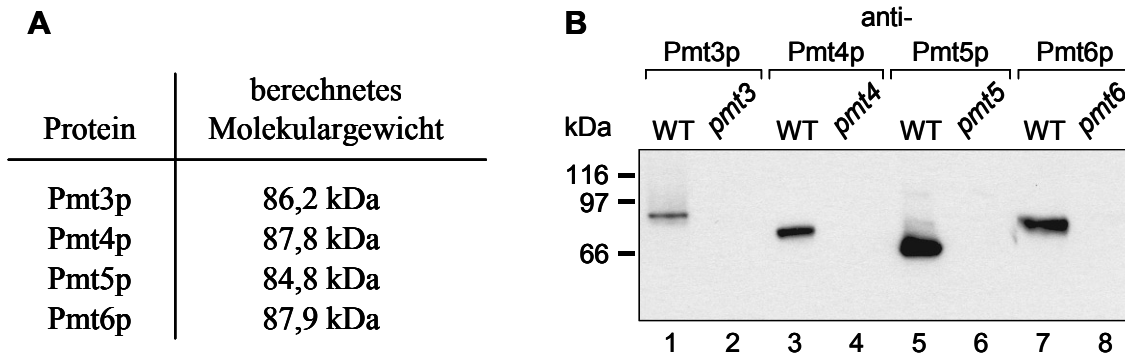
Arbeiten von Gentzsch und Mitarbeitern (1995) legten nahe, dass die beiden Protein O-Mannosyltransferasen – Pmt1p und Pmt2p – aus *Saccharomyces cerevisiae* *in vivo* interagieren. So fehlte in den jeweiligen Einfachmutanten, *pmt1* oder *pmt2*, die *in vitro* Enzymaktivität fast vollständig, wohingegen eine Steigerung der Transferaseaktivität nur dann erreicht werden konnte, wenn beide Proteine gleichzeitig überexprimiert wurden. Mit Hilfe einer anti-Pmt1p Immunoaffinitätssäule ließen sich schließlich die beiden Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p gemeinsam aufreinigen. Diese Komplexbildung erwies sich für eine effiziente *in vitro* Transferleistung, bei der ein Mannosylrest von Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man) auf Serin- oder Threoninseitenketten sekretorischer Proteine übertragen wird, als essentiell. Ob die Bildung von Proteinkomplexen eine generelle Eigenschaft der PMT-Familienmitglieder in *S. cerevisiae* darstellt, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

##### 3.1.1 Pmtp-spezifische Antikörper

Um potentielle Pmtp-Enzymkomplexe biochemisch zu erfassen, sollten zunächst durch Co-Immunpräzipitationen mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Hierfür und für den immunologischen Nachweis der Mannosyltransferasen Pmt3-6p, standen Immunseren von Kaninchen zur Verfügung (Pineda Antikörperservice, Berlin). Um bei einem Immunoblot unspezifische Kreuzreaktionen durch Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die polyklonalen Antikörper zunächst affinitätsgereinigt (siehe 2.2.3.11). Die Spezifität der gereinigten Antikörper wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 3-1 B ersichtlich, erkennen die unterschiedlichen polyklonalen Antikörper jeweils spezifisch Pmt3p (Spur 1), Pmt4p (Spur 3), Pmt5p (Spur 5) oder Pmt6p (Spur 7). In den entsprechenden *pmt*-Mutanten (Abb. 3-1 B, Spuren 2, 4, 6 und 8) fehlen diese Banden. Außerdem konnten weder im WT (Abb. 3-1 B, Spuren 1, 3, 5, 7), noch in den *pmt*-Mutanten Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die hohe Spezifität der affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper. Für den

immunologischen Nachweis der Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p standen bereits charakterisierte Immunseren zur Verfügung (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991; Gentzsch *et al.*, 1995).



**Abb. 3-1: Spezifität der polyklonalen anti-Pmt3-6p Antikörper.** (A) *Berechnetes Molekulargewicht von Pmt3-6p.* (B) *Antikörperspezifität.* NP40-Extrakte (10 µg Gesamtprotein) des Hefestammes SEY6210 (WT) und der Deletionsmutanten *pmt3-6* wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurden die affinitätsgereinigten anti-Pmt3p- (Spuren 1 und 2), anti-Pmt4p- (Spuren 3 und 4), anti-Pmt5p- (Spuren 5 und 6) und anti-Pmt6p- Antikörper (Spuren 7 und 8) eingesetzt.

### 3.1.2 Charakterisierung der PMT1- und PMT2-Familienmitglieder

#### 3.1.2.1 Nachweis von Proteinkomplexen über Co-Immunpräzipitation

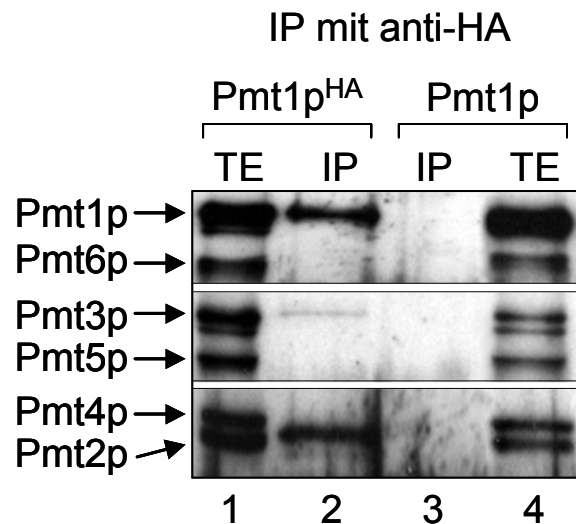
Wie bereits erwähnt, bilden Pmt1p und Pmt2p *in vivo* einen Enzymkomplex (Gentzsch *et al.*, 1995). Um weitere potentielle Interaktionspartner dieser Mannosyltransferasen mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen identifizieren zu können, wurden zunächst beide Proteine mit einem sechsfachen, C-terminalen Hämagglutinin (HA)-Epitop versehen. Die so entstandenen Fusionsproteine, Pmt1p<sup>HA</sup> und Pmt2p<sup>HA</sup>, zeigten *in vitro* die gleiche Mannosyltransferase-Aktivität wie die entsprechenden Wildtyp-Proteine (nicht gezeigt). Die Funktionalität der Enzyme wurde durch das Anhängen der Epitope also nicht beeinflusst. Mit Hilfe dieser Epitop-markierten Proteine und der Pmtsp-spezifischen Antikörper, sollte die Bildung von Enzymkomplexen innerhalb der PMT-Familie untersucht werden.

Pmt1p<sup>HA</sup> wurde in einer *pmt1* Mutante exprimiert und mit Triton X-100 aus der Membranfraktion gelöst (siehe 2.2.3.4). Mit Protein A-Sepharose gekoppelten,



monoklonalen anti-HA Antikörpern, konnte das HA-markierte Pmt1p aus dem Triton-Extrakt präzipitiert werden. Das gesamte Immunpräzipitat (IP) und ein Aliquot des Triton-Extraktes (TE) wurde auf 8 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dabei nacheinander mit den polyklonalen anti-Pmt1-6p Antikörpern inkubiert (Abb. 3-2, Spuren 1 und 2). Um die Spezifität der Immunpräzipitationsreaktion sicherzustellen, wurde das gleiche Experiment mit einem *pmt1* Stamm durchgeführt, welcher ein nicht HA-markiertes Pmt1p exprimiert (Abb. 3-2, Spuren 3 und 4). In diesem Fall waren keine Mannosyltransferasen im Präzipitat nachweisbar (Abb. 3-2, Spur 3).

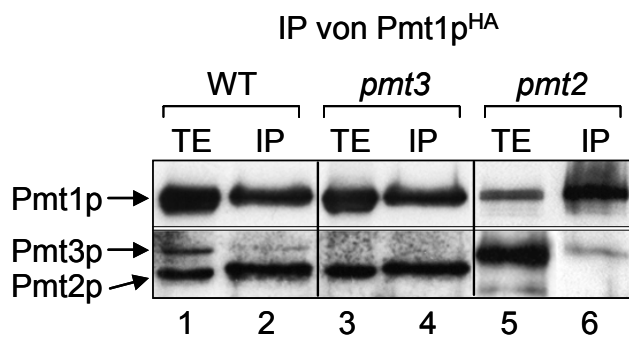
**Abb. 3-2: Immunpräzipitation von Pmt1p<sup>HA</sup> mit monoklonalen anti-HA Antikörpern.** Die Expression von Pmt1p<sup>HA</sup> (Spuren 1 und 2) und Pmt1p (Spuren 3 und 4) in einem *pmt1* Stammhintergrund erfolgte von den Plasmiden pSB56 bzw. pSB53. Pmt1p<sup>HA</sup> wurde mit einer monoklonalen anti-HA Affinitätsmatrix (anti-HA) spezifisch präzipitiert (2.2.3.5). Das Immunpräzipitat (IP) und ein Aliquot (35 µg Gesamtprotein) des in die Immunpräzipitation eingesetzten Triton-Extraktes (TE) wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Membranen wurden nacheinander mit den affinitäts-gereinigten anti-Pmt1-6p Antikörpern dekoriert.



Im Vergleich dazu konnte bei der Immunpräzipitation von Pmt1p<sup>HA</sup> der Interaktionspartner Pmt2p spezifisch co-präzipitiert werden (Abb. 3-2, Spur 2), was das Ergebnis von Gentzsch *et al.* (1995) bestätigt. Pmt4p, Pmt5p und Pmt6p waren im Präzipitat nicht nachweisbar. Dafür zeigte sich, dass Pmt3p spezifisch mit Pmt1p wechselwirkt. Wenn man den eingesetzten Triton-Extrakt dem Präzipitat gegenüberstellt (Abb. 3-2, vgl. Spuren 1 und 2), fällt auf, dass das Signal für Pmt3p vergleichsweise schwach ist. Zwei Gründe sind hierfür denkbar: i) Pmt3p liegt in substöchiometrischen Mengen in einem Pmt1p-Pmt2p-Pmt3p Komplex vor, oder ii) es existieren zwei voneinander unabhängige Komplexe, wobei der Pmt1p-Pmt2p Komplex dominant ist und Pmt1p-Pmt3p nur in geringer Menge in der Zelle vorliegt.

Um festzustellen, ob es sich hier um zwei unabhängige Pmt1p-Pmt2p bzw. Pmt1p-Pmt3p Komplexe, oder um einen Pmt1p-Pmt2p-Pmt3p Komplex handelt, wurde Pmt1p<sup>HA</sup> sowohl

in einem *pmt3*, als auch in einem *pmt2* Stammhintergrund exprimiert. Abbildung 3-4 zeigt die Immunpräzipitation von  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  aus diesen Stämmen. In Abwesenheit von  $\text{Pmt3p}$  war  $\text{Pmt2p}$  noch immer in der Lage mit  $\text{Pmt1p}$  zu interagieren (Abb. 3-3, Spur 4) und umgekehrt (Abb. 3-3, Spur 6).

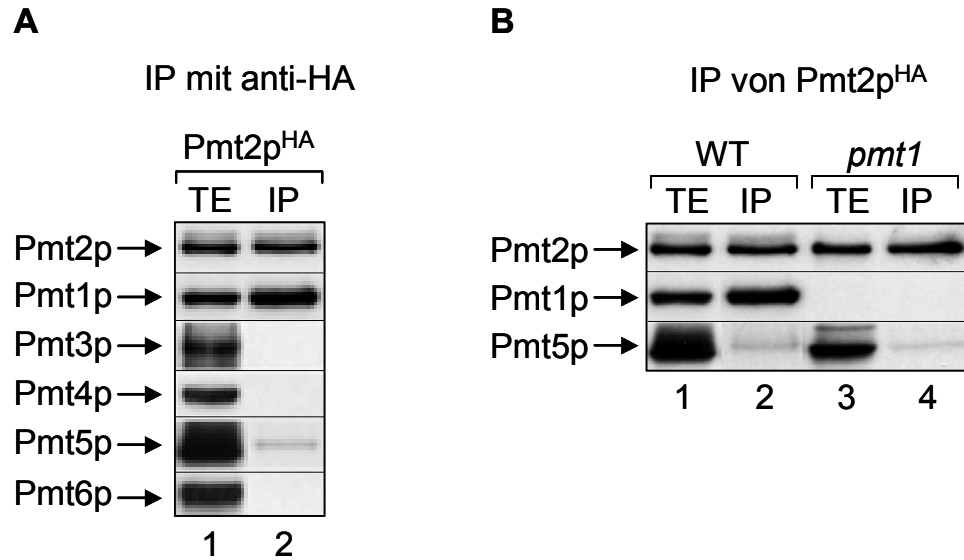


**Abb. 3-3:  $\text{Pmt1p}$  interagiert mit  $\text{Pmt2p}$  unabhängig von  $\text{Pmt3p}$ , und umgekehrt.**  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  wurde in den Stämmen *pmt1* (entspricht WT), *pmt1pmt3* (entspricht *pmt3*) und *pmt1pmt2* (entspricht *pmt2*) exprimiert und mit Hilfe einer anti-HA Affinitätsmatrix gefällt. Das Immunpräzipitat (IP) und ein Aliquot des Triton-Extraktes (TE; 35  $\mu\text{g}$  Protein) wurden auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt und über einen Immunoblot mit anti- $\text{Pmt1-3p}$  Antikörpern analysiert.

Um zu prüfen, ob unabhängige  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt2p}$  und  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt3p}$  Komplexe gebildet werden, wurde zusätzlich das Fusionsprotein  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$  in einem *pmt2* Deletionsstamm exprimiert und wie oben beschrieben immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 3-4 A (Spur 2) gezeigt, co-präzipitiert  $\text{Pmt1p}$  mit  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$ , nicht aber  $\text{Pmt3p}$ ,  $\text{Pmt4p}$  und  $\text{Pmt6p}$ . Zusammengekommen zeigen die Ergebnisse (Abb. 3-3 und Abb. 3-4), dass in der Bäckerhefe zwei unabhängige  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt2p}$  und  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt3p}$  Enzymkomplexe existieren.

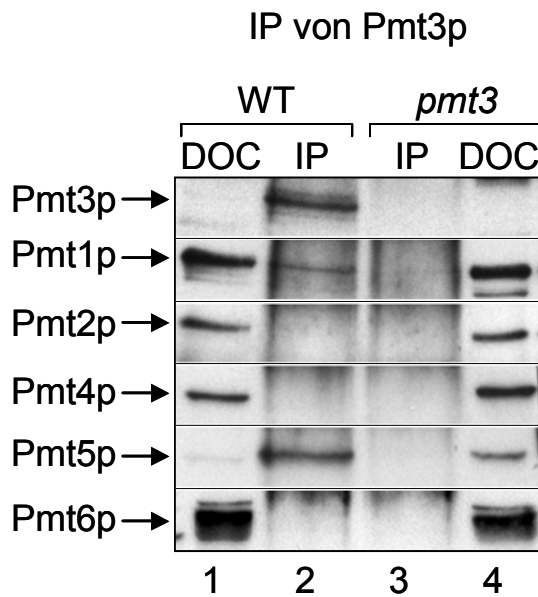
Zusätzlich konnten geringe Mengen an  $\text{Pmt5p}$  im Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 3-4 A, vgl. Spuren 1 und 2). Eine Immunpräzipitation von  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$  in einem *pmt1* Stammhintergrund zeigte, dass auch hier die Interaktion von  $\text{Pmt2p}$  und  $\text{Pmt5p}$  unabhängig von  $\text{Pmt1p}$  erfolgt (Abb. 3-4 B, Spur 4).

In der Bäckerhefe liegen somit eigenständige  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt2p}$ ,  $\text{Pmt1p}$ - $\text{Pmt3p}$  und  $\text{Pmt2p}$ - $\text{Pmt5p}$  Komplexe vor, wobei  $\text{Pmt1p}$  der favorisierte Interaktionspartner von  $\text{Pmt2p}$  ist.



**Abb. 3-4: Immunpräzipitation von Pmt2p<sup>HA</sup>.** Pmt2p<sup>HA</sup> wurde mit einer anti-HA Affinitätsmatrix präzipitiert (2.2.3.5). Das Präzipitat (IP) und ein Aliquot des Triton-Extraktes (TE; 35 µg Protein) wurden auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit polyklonalen anti-Pmt1-6p Antikörpern analysiert. (A) Pmt2p<sup>HA</sup> interagiert neben Pmt1p auch mit Pmt5p. Die Expression von Pmt2p<sup>HA</sup> (pVG80) erfolgte in einer *pmt2* Mutante. (B) Bildung eines von Pmt1p unabhängigen Pmt2p-Pmt5p Komplexes. Pmt2p<sup>HA</sup> wurde hier in einer *pmt2* (entspricht WT) und einer *pmt1pmt2* Mutante (entspricht *pmt1*) exprimiert.

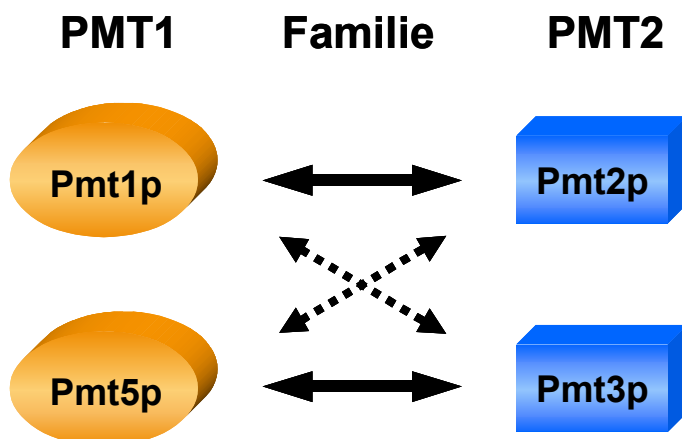
Zur Klärung der Frage, ob Pmt3p neben Pmt1p auch mit anderen Mannosyltransferasen Komplexe ausbildet, wurde eine weitere Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür erfolgte die Kopplung affinitätsgereinigter, polyklonaler anti-Pmt3p Antikörper an Protein A-Sepharose, wie unter 2.2.3.15 beschrieben. Vom Wildtyp-Hefestamm SEY6210 (WT) und der *pmt3* Mutante wurden Membranen isoliert und die darin enthaltenen Proteine mit 0,35 % Na-Deoxycholat und 0,5 % Triton X-100 solubilisiert (DOC-Extrakt). Wie in Abbildung 3-5 gezeigt, konnte Pmt3p mit Hilfe der anti-Pmt3p Antikörper spezifisch aus dem DOC-Extrakt angereichert werden (vgl. Spuren 1 und 2). Zusätzlich wurden geringe Mengen von Pmt1p im Präzipitat nachgewiesen, was die Ergebnisse von oben verifiziert. Die Mannosyltransferasen Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p waren nicht detektierbar. Das einzige Protein das sich neben Pmt3p stark anreichern ließ war Pmt5p (Abb. 3-5, vgl. Spuren 1 und 2). Daraus folgt, dass Pmt5p der favorisierte Interaktionspartner von Pmt3p ist. Auch hier erfolgte die Interaktion zwischen den Mannosyltransferasen unabhängig voneinander (vgl. Abb. 3-3, 3-5, 3-6, und Daten nicht gezeigt). Es kann von einer spezifischen Immunpräzipitation ausgegangen werden, da bei dem *pmt3* Kontrollstamm keinerlei Pmtps im Präzipitat detektiert werden konnten (Abb. 3-5, Spur 3).



**Abb. 3-5: Immunpräzipitation von Pmt3p mit polyklonalen anti-Pmt3p Antikörpern.** Von den Hefestämmen SEY6210 (WT) und *pmt3* wurden DOC-Extrakte präpariert (siehe 2.2.3.4) und Pmt3p mit Protein A-Sepharose gekoppelten anti-Pmt3p Antikörpern präzipitiert. Das Immunpräzipitat (IP) und ein Aliquot des DOC-Extraktes (DOC; 35 µg Protein) wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über einen Immunoblot mit polyklonalen anti-Pmt1-6p Antikörpern analysiert.

Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass sich alle bisher bekannten Protein O-Mannosyltransferasen drei PMT-Subfamilien zuordnen lassen. Diese Untergruppen werden als PMT1-, PMT2- und PMT4-Subfamilien bezeichnet, da sie jeweils Enzyme mit der größten Homologie zu ScPmt1p, ScPmt2p bzw. ScPmt4p enthalten (siehe Abb. 1-2).

Auffallend ist nun, dass die PMT1-Familienmitglieder der Bäckerhefe, Pmt1p und Pmt5p, ausschließlich mit den PMT2-Familienmitgliedern, Pmt2p und Pmt3p, interagierten, wobei die beiden Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexe die dominanten Verbindungen darstellen (Abb. 3-6). Eine Protein/Protein Wechselwirkung innerhalb einer PMT-Subfamilie wurde nicht beobachtet. Zusätzlich konnte für Pmt1p, eine Interaktion mit sich selbst ausgeschlossen werden (Girrbach, 1999).



**Abb. 3-6: Interaktionsmodell basierend auf den Beobachtungen der Co-Immunpräzipitationen.** Durchgehende Pfeile deuten dominante Interaktionen zwischen Pmt1p und Pmt2p bzw. zwischen Pmt5p und Pmt3p an. Die Wechselwirkungen der in geringen Mengen vorliegenden Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe sind in gestrichelten Pfeilen symbolisiert.

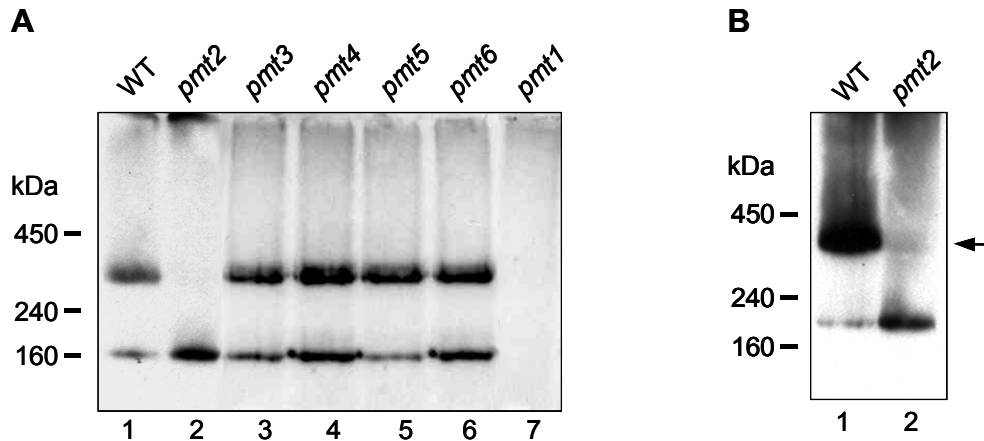
### 3.1.2.2 Nachweis der Pmtp-Komplexe über "Blaue Nativgel-Elektrophorese"

Wie bereits gezeigt, waren die Enzymkomplexe Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p, im Vergleich zu Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p, in den Präzipitaten nur in geringen Mengen nachweisbar (Abschnitt 3.1.2.1). Diese Beobachtung sollte mit einer weiteren, unabhängigen Methode verifiziert werden. Zudem war nicht völlig auszuschließen, dass diese "alternativen" Komplexe artifiziell während der Co-Immunpräzipitationsreaktion entstehen. Aus diesem Grund wurde eine "Blaue-Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese" (BN-PAGE oder Blaugel) durchgeführt, bei der hochmolekulare Membranprotein-Komplexe in nativer Form aufgetrennt werden können. Die von Schägger und von Jagow (1991) beschriebene Methode beruht darauf, dass die solubilisierten Proteinkomplexe durch den Zusatz des hydrophoben Farbstoffes "Serva blue G" eine negative Ladung erhalten. Die Komplexe aggregieren wegen der elektrostatischen Abstoßung nicht und ihre Tertiärstruktur und Funktion bleiben erhalten. Durch die negative Ladung können die Komplexe dann über ein entsprechendes Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Für den Nachweis der Pmtp-Komplexe wurden NP40 (Nonidet P40)-Extrakte vom Wildtyp und den *pmt1-6* Mutanten isoliert (siehe 2.2.3.4). Um sicherzustellen, dass die Mannosyltransferasen in den NP40-Extrakten in aktiver Form vorliegen, wurde standardmäßig die Transferaseleistung mittels *in vitro* Enzymtest I (siehe 2.2.3.12) kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die Auftrennung der Extrakte erfolgte über ein 4 – 13 % Polyacrylamidgel unter den bei 2.2.3.2 und 2.2.3.7 beschriebenen Bedingungen. Die Pmtp-Proteinkomplexe wurden über Western Blot durch spezifische anti-Pmt1-6p Antikörper identifiziert.

Abbildung 3-7 A zeigt einen Immunoblot der mit anti-Pmt1p Antikörpern dekoriert wurde. Diese Mannosyltransferase war in zwei Proteinbanden mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten (MG) von ~170 kDa bzw. ~310 kDa zu finden. Bei der 170 kDa Bande handelt es sich vermutlich um das monomere Pmt1p. Der große Unterschied im apparenten MG von 170 kDa in der BN-PAGE zu 92 kDa bei der SDS-Gelelektrophorese kann dadurch erklärt werden, dass im Blaugel das Ladungs- zu Masse-Verhältnis der Protein-Farbstoffkomplexe nicht konstant ist und somit eine Auftrennung nach MG nicht erfolgt (Schägger *et al.*, 1994). Die Bildung homodimerer Pmt1p Komplexe konnte, wie bereits erwähnt, durch Co-Immunpräzipitation ausgeschlossen werden. Neben der monomeren 170 kDa Form wurde eine Pmt1p-spezifische 310 kDa Bande detektiert (Abb.

3-7 A, vgl. Spuren 1 und 7). Ähnliche Proteinkomplexe mit einem apparenten MG von ~300 bis 330 kDa konnten mit anti-Pmt2p, -Pmt3p und -Pmt5p spezifischen Antikörpern identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3-7: Identifizierung des Pmt1p-spezifischen Proteinkomplexes über BN-PAGE.** Vom Wildtyp (WT) und den *pmt1-6* Mutanten wurden NP40-Extrakte isoliert, jeweils 40 µg Gesamtprotein über ein 4 – 13 % Gradientengel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Pmt1p Antikörpern analysiert. (A) Pmt1p läuft in der monomeren Form mit einem apparenten MG von ~170 kDa und die Pmt1p-spezifischen Komplexe bei ~310 kDa. (B) Der Röntgenfilm wurde hier länger exponiert um schwache Signale sichtbar zu machen.

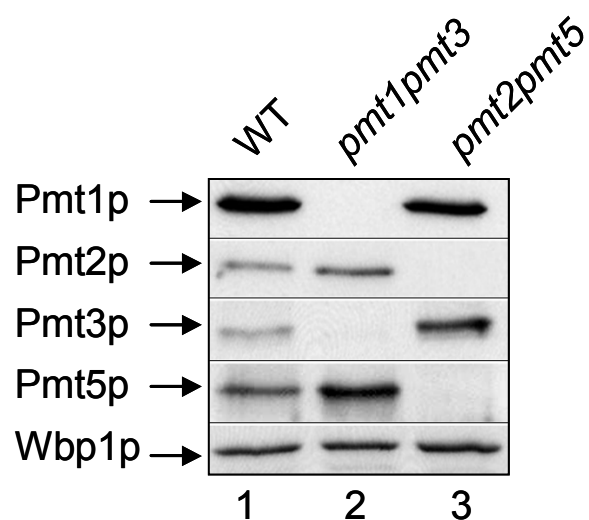
Geht man davon aus, dass Pmt2p der Hauptinteraktionspartner von Pmt1p ist, dann sollte in dessen Abwesenheit (*pmt2* Mutante) der größte Teil von Pmt1p in der monomeren 170 kDa Form vorliegen. Im Gegensatz dazu erwartet man bei einem nur in geringen Mengen vorhandenen Pmt1p-Pmt3p Komplex, dass in einer *pmt3* Mutante die Mannosyltransferase Pmt1p vorwiegend in der hochmolekularen 310 kDa Form nachzuweisen ist. Abbildung 3-8 A (vgl. Spuren 2 und 3) zeigt genau dieses Muster. Nach langer Exposition des Röntgenfilms war in der *pmt2* Mutante dennoch ein schwaches Signal bei 310 kDa detektierbar (Abb. 3-7 B, Spur 2). Diese hochmolekularen Komplexe konnten zudem mit anti-Pmt2p und anti-Pmt3p Antikörpern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen der Enzyme Pmt4p, Pmt5p oder Pmt6p hatte dagegen keinen Einfluss auf das Laufverhalten von Pmt1p (Abb. 3-7 A, Spuren 4 – 6). Somit bestätigen diese Daten die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation: Pmt1p interagiert sowohl mit Pmt2p als auch mit Pmt3p, wobei Pmt2p der bevorzugte Komplexbpartner ist. Für Pmt3p konnten über BN-PAGE ähnliche Aussagen getroffen werden. Hier war in Abwesenheit von Pmt5p so gut

wie kein Pmt3p in hochmolekularer Form nachweisbar, was auf einen dominanten Pmt5p-Pmt3p Komplex schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2.3 *Pmtp Proteinlevel in pmt Doppelmutanten*

Die Menge der im Wildtyp vorliegenden Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe ist, nach den vorliegenden Ergebnissen zu urteilen, sehr gering. Damit stellte sich die Frage, ob die Interaktionen zwischen diesen Mannosyltransferasen physiologisch von Bedeutung sind. Denkbar wäre, dass die Wechselwirkung aufgrund der hohen Homologie zwischen den PMT1- bzw. zwischen den PMT2-Familienmitgliedern zustande kommt. Pmt1p und Pmt5p zeigen eine Homologie von 72 % (Identität 53 %); Pmt2p und Pmt3p sogar 81 % (Identität 65 %). Eine andere Möglichkeit wäre, dass diese "alternativen" Komplexe gebildet werden um den Verlust eines Hauptinteraktionspartners zu kompensieren. Um letztere Hypothese zu überprüfen wurden *pmt1pmt3* und *pmt2pmt5* Mutanten, in denen die dominanten Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexe nicht mehr ausgebildet werden können, charakterisiert (vgl. Abb. 3-6). Vom Wildtyp Hefestamm und den Doppelmutanten wurden Membranen isoliert, diese über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Wie in Abbildung 3-8 gezeigt, liegt in der *pmt1pmt3* Mutante mehr Pmt2p und Pmt5p im Vergleich zum Wildtyp vor (vgl. Spuren 1 und 2). In der *pmt2pmt5* Mutante war der Pmt3p-Spiegel deutlich erhöht. Der Pmt1p-Level blieb dagegen unverändert (Abb. 3-8, vgl. Spuren 1 und 3), was darauf hindeuten könnte, dass Pmt1p nicht in limitierender Menge vorliegt.

**Abb. 3-8: Proteinniveau von Pmt1-3p und -5p in den Mutanten *pmt1pmt3* und *pmt2pmt5*.** Vom Hefe-Wildtyp SEY6210 (WT, Spur 1) und den *pmt1pmt3* (Spur 2) und *pmt2pmt5* (Spur 3) Mutanten wurden Membranen isoliert, Aliquots (40 µg Protein) auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Western Blot analysiert. Zur Detektion von Pmt1p, Pmt2p, Pmt3p, Pmt5p und Wbp1p wurden die entsprechenden polyklonalen Antikörper eingesetzt. Wbp1p dient hier als Ladungskontrolle.



Die Proteinmenge von Pmt4p und Pmt6p war in den untersuchten Doppelmutanten und im Wildtyp unverändert (Daten nicht gezeigt). Wbp1p (wheat germ agglutinin binding protein) (te Heesen *et al.*, 1992; te Heesen *et al.*, 1993), eine Proteinuntereinheit der Oligosaccharyltransferase, diente als Ladungskontrolle, um sicherzustellen, dass die gleichen Proteinmengen elektrophoretisch aufgetrennt wurden (Abb. 3-8, Spuren 1 – 3). Zusammengenommen legen diese Beobachtungen nahe, dass in Abwesenheit der bevorzugten Interaktionspartner, Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe akkumulieren.

#### **3.1.2.4 Chemische Quervernetzung von Pmt5p-Pmt2p Komplexen**

Um die Existenz "alternativer" Komplexe zu untermauern, wurde versucht die unter Umständen schwache und/oder transiente Wechselwirkung zwischen Pmt2p und Pmt5p mit Hilfe chemischer Quervernetzung zu fixieren. Der hierfür verwendete Quervernetzer *o*-Phtaldialdehyd (OPA) reagiert über die beiden Aldehydgruppen spezifisch mit primären und sekundären Aminen und kann so Proteine, die miteinander interagieren kovalent verknüpfen. Voraussetzung ist dabei die Annäherung von Proteinen, damit OPA beide Untereinheiten vernetzen kann. Eine kovalente Bindung zwischen Proteinen die nicht miteinander wechselwirken findet somit nicht statt. Für die chemische Quervernetzungsreaktion wurden Membranen vom Wildtyp, einer *pmt1pmt3* Mutante und von einem Pmt2p-überexprimierenden Wildtyp-Stamm (Expression von *PMT2/YEp352*) isoliert. Die chemische Quervernetzung der Membranproteine erfolgte durch Zugabe von OPA in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M und anschließender Inkubation (30 min) bei 25°C im Dunkeln. Die Analyse der Proben erfolgte über Western Blot.

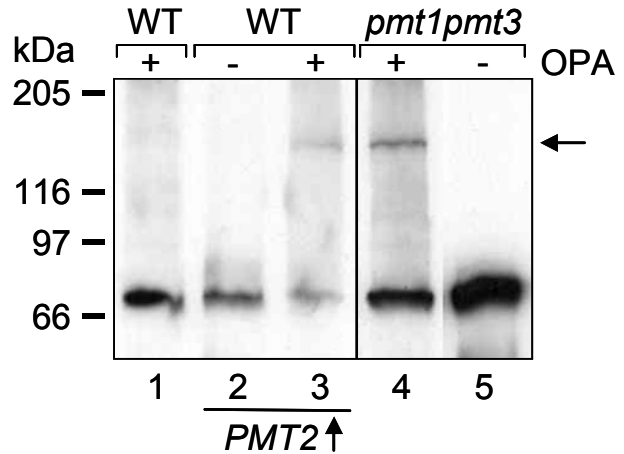
Wie in Abbildung 3-9 zu erkennen, konnte, nach Zugabe von OPA, nur in der Pmt2p überexprimierenden Wildtyp-Hefe ein ~152 kDa Komplex identifiziert werden (Spur 3). Das berechnete MG von Pmt2p und Pmt5p beträgt ~86,9 bzw. ~84,8 kDa. Da beide Proteinmonomere im SDS-Polyacrylamidgel ein geringeres apparentes MG aufweisen (vgl. Abb. 3-9, Pmt5p-Monomer in Spuren 1 – 5), könnte es sich bei der ~152 kDa Form um ein Pmt5p-Pmt2p Heterodimer handeln. Tatsächlich wurde dieser hochmolekulare Komplex sowohl von anti-Pmt5p (Abb. 3-9, vgl. Spuren 1 und 3), als auch von anti-Pmt2p Antikörpern (Daten nicht gezeigt) spezifisch erkannt. Im Gegensatz dazu war in der



*pmt1pmt3* Mutante der hochmolekulare Komplex auch ohne Überexpression von Pmt2p nachweisbar (Abb. 3-9, Spur 4).

**Abb. 3-9:**

**Chemische Quervernetzung des Pmt5p-Pmt2p Komplexes mit OPA.** Membranen vom Wildtyp SEY6210 (WT, Spur 1), einer *pmt1pmt3* Mutante (Spuren 4 und 5) und einem WT-Stamm, der *PMT2* von dem "Multicopy"-Plasmid YEp352 überexprimiert (*PMT2*, Spuren 2 und 3) wurden mit (+) oder ohne (-) OPA (50  $\mu$ M) inkubiert, auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit anti-Pmt5p Antikörpern analysiert.



Dies macht deutlich, dass der erhöhte Pmt2p- und Pmt5p-Spiegel in der *pmt1pmt3* Mutante ausreicht, um entsprechende Enzymkomplexe zu akkumulieren. Dagegen wechselwirken im Wildtyp die beiden Mannosyltransferasen bevorzugt mit ihren favorisierten Interaktionspartnern und die Pmt5p-Pmt2p Komplexe können nicht mehr nachgewiesen werden. Liegt allerdings Pmt2p in großen Mengen in der Zelle vor (Überexpression im WT), dann kann der "Überschuss" des Proteins mit Pmt5p interagieren und unter diesen Bedingungen ein Enzymkomplex nachgewiesen werden.

### 3.1.2.5 Mannosyltransferase-Aktivität in *pmt* Mutanten

Wie bereits unter 3.1.2.3 gezeigt, ist der Proteinlevel von Pmt2p und Pmt5p in einer *pmt1pmt3*, und Pmt3p in einer *pmt2pmt5* Mutante erhöht (Abb. 3-8). Mit Hilfe der chemischen Quervernetzung konnte zudem gezeigt werden, dass der Pmt5p-Pmt2p Komplex in der *pmt1pmt3* Mutante akkumuliert (Abb. 3-9). Dies deutet auf einen Kompensationsmechanismus hin, bei dem die Mannosylierung auch dann sichergestellt wird, wenn der bevorzugte Partner fehlt. In einem *in vitro* Enzymtest sollte deshalb geprüft werden, ob die Bildung von Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexen zur Erhöhung der Transferaseleistung in den entsprechenden Doppelmutanten führt. In diesem Enzymtest (siehe 2.2.3.12, Enzymtest II) wird vorwiegend die Aktivität von Pmt1p und Pmt2p registriert.

Die Mannosyltransferase-Aktivität war in den *pmt1* und *pmt1pmt2* Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, drastisch reduziert (Tabelle 3-1). In der Mutante *pmt1pmt3*, in der Pmt5p-Pmt2p Komplexe akkumulieren, wurde eine Aktivitätssteigerung von 68 % gegenüber der *pmt1pmt2* Mutante gemessen. In der *pmt2pmt5* Mutante, in der Pmt1p-Pmt3p Komplexe gebildet werden können, lag die Steigerung bei 43 %.

Stamm	cpm/mg/h	rel. Aktivität %
WT	107448 ± 1894	
<i>pmt1</i>	12012 ± 1026	
<i>pmt1pmt2</i>	13720 ± 732	100
<i>pmt1pmt3</i>	23080 ± 780	168
<i>pmt2pmt5</i>	19564 ± 1156	143

**Tabelle 3-1: *In vitro* Transferaseaktivität in *pmt1pmt3* und *pmt2pmt5* Mutanten.** Von den Stämmen SEY6210 (WT), *pmt1*, *pmt1pmt2*, *pmt1pmt3* und *pmt2pmt5* wurde jeweils 250 µg Membranprotein in den Enzymtest II eingesetzt. Gemessen wurde die Übertragung der [<sup>14</sup>C]-Mannose, von Dol-P-Man auf das Akzeptorpeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub>. Gezeigt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Mitglieder der PMT1-Subfamilie (Pmt1p und Pmt5p) mit den Mitgliedern der PMT2-Subfamilie (Pmt2p und Pmt3p) interagieren. Die Enzymkomplexe Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p stellen dabei die dominanten Formen dar. Unter bestimmten Bedingungen werden die weniger häufig vorliegenden Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p gebildet, um die Mannosylierung von Proteinen zu gewährleisten (siehe Abb. 3-6).

### 3.1.2.6 *Pmt6p bildet hochmolekulare Komplexe*

Pmt6p ist das dritte Mitglied der PMT2-Subfamilie. Wie bereits gezeigt, war diese Mannosyltransferase nicht in der Lage an Pmt1p, Pmt2p oder Pmt3p zu binden (3.1.2.1). Es ließ sich auch dann keine Interaktion mit anderen Pmtps nachweisen, als Pmt6p durch Protein A-Sepharose gekoppelte anti-Pmt6p Antikörper gefällt wurde (Daten nicht gezeigt). Denkbar wäre, dass die Bindung der gegen den N-terminalen Bereich generierten polyklonalen anti-Pmt6p Antikörper (Met1 – Gln86) eine Wechselwirkung mit möglichen Interaktionspartnern verhindert. Aus diesem Grund wurde Pmt6p mit einem 9-fachen *c-myc*-Epitop am C-terminalen Ende fusioniert (Plasmid pVG38 = *PMT6<sup>myc</sup>* in YEp352; siehe 2.2.2.12). Mit diesem Konstrukt sollte getestet werden, ob die Mannosyltransferase mit anderen Pmtps und/oder mit sich selbst interagiert. Die Funktionalität des Fusionsproteins wurde durch die *myc*-Epitope nicht beeinflusst. Pmt6p war nach wie vor

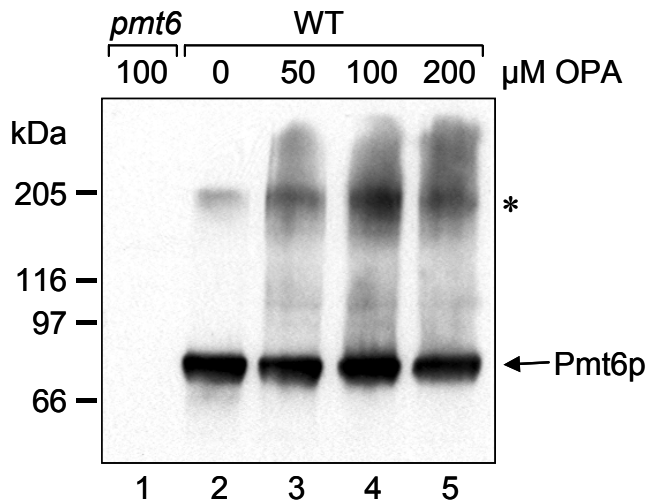
in der Lage das Substratprotein Gas1p (Glycophospholipid-anchored surface protein) (Vai *et al.*, 1991; Gentzsch und Tanner, 1997) vollständig zu mannosylieren (Daten nicht gezeigt).

Um nun zu prüfen ob Pmt6p mit sich selbst interagiert, wurde der Wildtyp SEY6210 (WT) und die *pmt6* Mutante mit dem Plasmid pVG38 (*PMT6<sup>myc</sup>*/YEp352) transformiert und DOC-Extrakte präpariert. Die Immunpräzipitation von Pmt6p<sup>myc</sup> mit Hilfe einer monoklonalen anti-myc Affinitätsmatrix (Babco) erfolgte wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Die Präzipitate wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über einen Immunoblot analysiert. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts von Pmt6p und Pmt6p<sup>myc</sup> (Differenz ~25 kDa), konnten beide Formen im WT DOC-Extrakt mit einem anti-Pmt6p Antikörper eindeutig angesprochen werden. Im Immunpräzipitat des Wildtyps befand sich ausschließlich die myc-markierte Form; nicht aber die Pmt6p Wildtypform. Somit konnte eine Pmt6p-Pmt6p Wechselwirkung ausgeschlossen werden. Außerdem waren im Präzipitat, neben Pmt6p<sup>myc</sup>, keine weiteren Mannosyltransferasen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Um zu prüfen, ob Pmt6p überhaupt hochmolekulare Formen ausbilden kann, wurden die Membranproteine in Hefemembranen chemisch quervernetzt. Die Reaktion wurde, wie unter 2.2.3.8 beschrieben, mit 50 – 200 µM *o*-Phtaldialdehyd (OPA) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein 8 % SDS-Polyacrylamidgel.

Abbildung 3-10 zeigt die Western Blot Analyse der Quervernetzungsreaktion. Eine 81 kDa Bande konnte eindeutig dem monomeren Pmt6p zugeordnet werden (Abb. 3-10, vgl. Spur 1 mit 2 – 5). In Gegenwart von OPA war eine weitere Bande mit einem apparenten MG von ~200 kDa detektierbar (Abb. 3-10, Spuren 3 – 5\*). Somit kann ein Pmt6p-spezifischer Komplex durch den Quervernetzer stabilisiert werden. Allerdings war die 200 kDa Form im Ansatz ohne OPA bereits schwach zu erkennen (Abb. 3-10, Spur 2). Dies ist möglicherweise auf nicht vollständig dissoziierte Proteine (trotz reduzierender Elektrophorese-Bedingungen) zurückzuführen, da die Proben vor dem Beladen des Gels nicht aufgekocht werden dürfen, um die Aggregatbildung hydrophober Proteine zu vermeiden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Dan und Lehrman (1997) beschrieben.

Zusätzlich konnten im Blaugel zwei Pmt6p-spezifische Banden mit apparenten Molekulargewichten von ~160 und ~300 kDa, sowohl im Wildtyp als auch in *pmt1-5* Mutanten identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3-10: Chemische Quervernetzung von Pmt6p mit OPA.** Der Hefestamm *pmt6* wurde mit dem leeren Vektor YEp352 (*pmt6*) und mit dem Plasmid *PMT6*/YEp352 (WT) transformiert. Die chemische Quervernetzung erfolgte wie unter 2.2.3.8 beschrieben mit 0, 50, 100 und 200  $\mu$ M OPA. Die Proteine wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Pmt6p Antikörpern inkubiert. (\*) zeigt den Pmt6p-spezifischen Proteinkomplex.

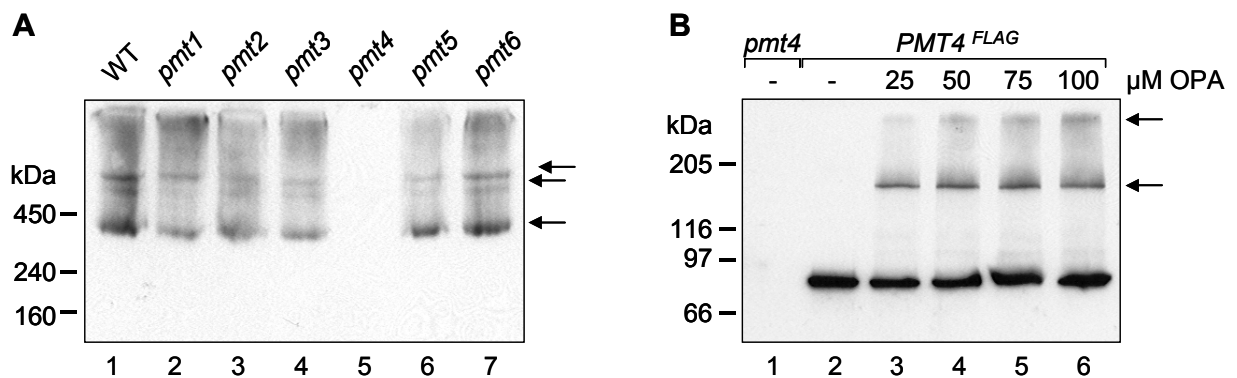
Pmt6p ist also in der Lage mit einem oder mehreren Proteinen zu interagieren. Der Verlust einzelner Mannosyltransferasen hatte auf die Ausbildung des Pmt6p-Komplexes keinen Einfluss (BN-PAGE, Daten nicht gezeigt). Pmt6p interagiert somit nicht mit den anderen Pmtps der Bäckerhefe. Des weiteren konnte eine Interaktion mit sich selbst ausgeschlossen werden. Welches Protein mit Pmt6p wechselwirkt ist allerdings nicht klar und wird weitere Untersuchungen erfordern.

### 3.1.3 Charakterisierung der PMT4-Subfamilie

Pmt4p, der einzige Vertreter der PMT4-Subfamilie in *S. cerevisiae*, konnte in keinem der oben charakterisierten Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Der Versuch einzelne Mannosyltransferasen über eine Immunpräzipitation von Pmt4p (mit Pmt4p-spezifischen Antikörpern) anzureichern, führte ebenfalls zu keinem Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte auch hier geprüft werden, ob Pmt4p Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen kann.

### 3.1.3.1 Nachweis hochmolekularer *Pmt4p*-Komplexe

NP40-Extrakte vom Wildtyp und *pmt1-6* Mutanten wurden wie oben beschrieben elektrophoretisch auf einem Blaugel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Pmt4p Antikörpern analysiert. Im Gegensatz zu den Mitgliedern der PMT1- und PMT2-Subfamilien, konnten hier drei Pmt4p-spezifische Banden detektiert werden (Abb. 3-11 A, Spuren 1 – 4 und 6 – 7). Interessant ist auch, dass die Pmt4p-Komplexe ein völlig anderes apparentes Laufverhalten als die restlichen Mannosyltransferasen zeigten. Da die Proteinkomplexe jedoch nicht nach dem Molekulargewicht auftrennen, ist eine Aussage über die tatsächliche Größe der Komplexe nicht möglich. Das Fehlen einzelner Mannosyltransferasen wirkte sich auf die Pmt4p-Komplexbildung nicht negativ aus (Abb. 3-11 A, Spuren 1 – 4 und 6 – 7), was die bisherigen Ergebnisse bestätigte.



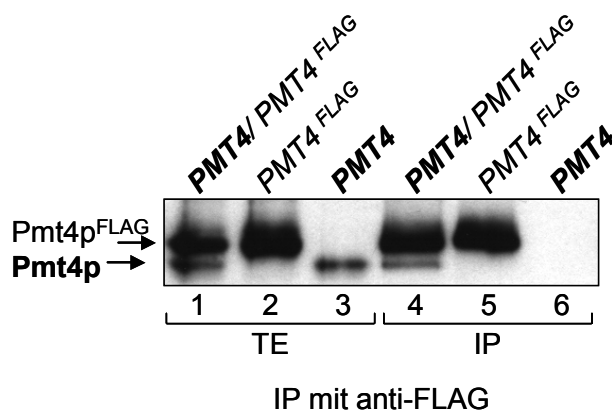
**Abb. 3-11 Nachweis von Pmt4p-Komplexen über BN-PAGE und chemische Quervernetzung.** (A) *BN-PAGE*. NP40-Extrakte (40  $\mu$ g Protein) vom WT und *pmt1-6* Mutanten wurden auf einem 4 – 13 % Nativgel aufgetrennt und der Western Blot mit anti-Pmt4p Antikörpern inkubiert. Pmt4p-spezifische Banden sind mit Pfeilen markiert. (B) *Chemische Quervernetzung*. Der Hefestamm *pmt4* wurde mit dem Vektor pRS423 (*pmt4*) und dem Plasmid pJK4-B1 (*PMT4<sup>FLAG</sup>*) transformiert. Die isolierten Membranen wurden mit 0, 25, 50, 75 und 100  $\mu$ M OPA inkubiert, über ein 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-Pmt4p Antikörpern analysiert. Pmt4p Komplexe sind mit Pfeilen markiert.

Zusätzlich konnten Pmt4p-Komplexe bei der chemischen Quervernetzung mit OPA nachgewiesen werden. Für diesen Zweck wurden vier FLAG-Epitope C-terminal an Pmt4p fusioniert, dieses Fusionsprotein in einer *pmt4* Mutante exprimiert und Membranen isoliert. Die Funktionalität des Fusionsproteins konnte durch die Komplementation des temperatursensitiven Phänotyps einer *pmt1pmt4* Mutante bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Quervernetzung der Membranproteine erfolgte mit 25 – 100  $\mu$ M OPA. Die Reaktionsansätze wurden auf einem 8 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über

Western Blot mit anti-Pmt4p Antikörpern analysiert. Abbildung 3-11 B zeigt das monomere Pmt4p<sup>FLAG</sup> mit einem apparenten MG von ~90 kDa (errechnetes MG 92,6 kDa) in den Spuren 2 bis 6. Durch die Zugabe des Quervernetzers konnte ein hochmolekularer Komplex mit einem apparenten MG von ~165 kDa detektiert werden. Zusätzlich war eine schwache Bande mit einem apparenten MG von > 200 kDa, etwas unterhalb der Sammel-/Trenngel Grenze zu erkennen (Abb. 3-11 B, Spuren 3 – 6). In diesem Fall kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Artefakt handelt, da das Signal zum einen sehr schwach ist und zum anderen nicht weit im Trenngel detektiert wurde. Berücksichtigt man jedoch die Daten der Nativgel-Elektrophorese (Abb. 3-11 A), dann könnte es sich hier um einen weiteren Pmt4p-spezifischen Komplex, mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa handeln.

### 3.1.3.2 Identifizierung eines Pmt4p-Pmt4p Komplexes

Da Pmt4p nicht mit anderen Mannosyltransferasen interagiert, aber dennoch hochmolekulare Proteinkomplexe bildet, sollte nun geklärt werden, ob Pmt4p eine homotypische Wechselwirkung mit sich selbst eingeht. Um dies zu testen wurde Pmt4p<sup>FLAG</sup> im Wildtyp und in einer *pmt4* Mutante exprimiert. Das FLAG-markierte Pmt4p wurde mit einer monoklonalen anti-FLAG Affinitätsmatrix immunpräzipitiert, die Präzipitate und Aliquots der Triton-Extrakte über ein 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und wie zuvor beschrieben analysiert. Durch einen Unterschied im MG von ~5 kDa zwischen Pmt4p und Pmt4p<sup>FLAG</sup>, konnten beide Proteine im Immunoblot mit anti-Pmt4p Antikörpern detektiert werden.



**Abb. 3-12: Co-Immunpräzipitation von Pmt4p durch Pmt4p<sup>FLAG</sup>.** pJK4-B1 (*PMT4<sup>FLAG</sup>/pRS423*) wurde im Wildtyp SEY6210 (*PMT4/PMT4<sup>FLAG</sup>*) und in der *pmt4* Mutante (*PMT4<sup>FLAG</sup>*) exprimiert. Für die Negativkontrolle wurde der Vektor pRS423 in den WT transformiert (*PMT4*). Die Immunpräzipitation von Pmt4p<sup>FLAG</sup> aus Triton-Extrakten erfolgte mit einer monoklonalen anti-FLAG Affinitätsmatrix (anti-FLAG). Das Präzipitat (IP) und ein Aliquot des Triton-Extraktes (TE, 30 µg Protein) wurde auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Pmt4p Antikörpern analysiert.

Wie aus Abbildung 3-12 ersichtlich, war Pmt4p<sup>FLAG</sup> in der Lage das Wildtyp-Pmt4p spezifisch zu binden und zu fällen (vgl. Spuren 4 – 6). Dies zeigt, dass Pmt4p als Homodimer in einem Enzymkomplex vorliegt. Die mittels chemischer Quervernetzung nachgewiesene ~165 kDa Form (Abb. 3-11 B, Spuren 3 – 6), entspricht somit einem Pmt4p-Pmt4p Komplex. Ob der hochmolekulare Enzymkomplex von > 200 kDa ausschließlich von Pmt4p-Untereinheiten gebildet wird, oder ob noch weitere ER-residente Proteine assoziiert sind, kann derzeit nicht beantwortet werden.

### 3.2 MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER PMT-PMT WECHSELWIRKUNG

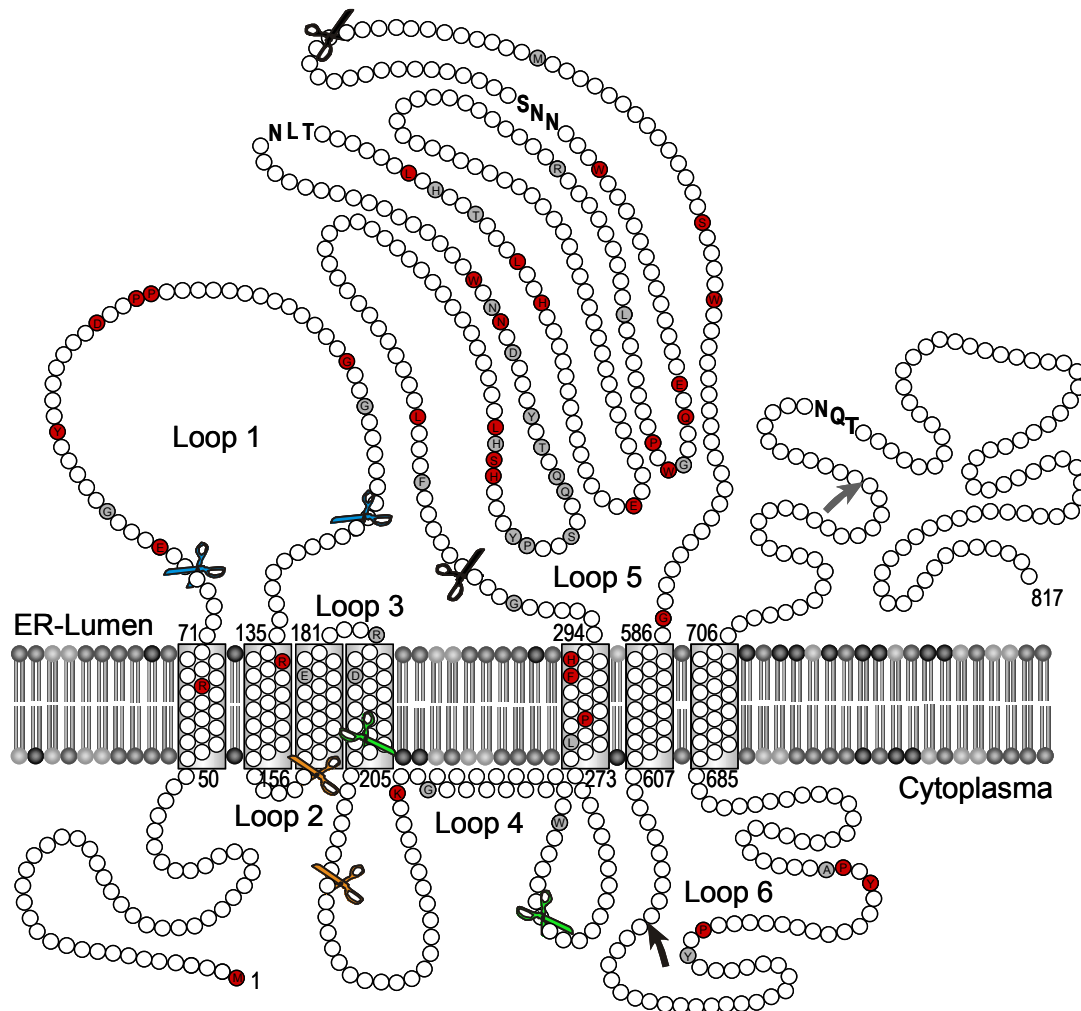
Die Topologie des Pmt1p Membranproteins konnte von Strahl-Bolsinger und Scheinost (1999) geklärt werden. Demzufolge durchspannt das Enzym die ER-Membran sieben mal, wobei der N-Terminus im Cytoplasma und der C-Terminus im ER-Lumen zum liegen kommt (vgl. Abb. 3-13). Eine große hydrophile Domäne, zwischen Transmembranspanne V und VI (Loop 5) erwies sich für die Transferaseaktivität als essentiell (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Da alle Mannosyltransferasen ein fast identisches Hydropathieprofil zeigen (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), kann man davon ausgehen, dass die Membrantopologie auf alle Pmtps übertragbar ist. Basierend auf diesem Modell wurde mit einer Struktur/Funktions-Analyse – mit Pmt1p als Modellprotein – begonnen (Girrbach, 1999). Deletionsanalysen deuteten darauf hin, dass der N-terminale Bereich (PMT-Domäne; siehe Einleitung 1.1.1.2) des Enzyms für die Interaktion mit Pmt2p eine wichtige Rolle spielt.

#### 3.2.1 Charakterisierung der Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung

##### 3.2.1.1 Pmt1p Deletionsmutanten

Wie über Co-Immunpräzipitationen gezeigt werden konnte, führen die Deletionen des ER-orientierten Loop 1 ( $\Delta$ Phe76 – Ile124), der Transmembranspannen (TM) III und IV ( $\Delta$ Val161 – Ala211), des cytoplasmatisch orientierten Loop 4 ( $\Delta$ Phe203 – Leu259) oder der C-terminalen Domäne ( $\Delta$ Ile617 – Glu817) von Pmt1p (Abb. 3-13) jeweils zum Verlust der Pmt2p-Bindungsfähigkeit. Die Deletionen der großen, ER-orientierten Loop 5 Domäne

( $\Delta$ Ser304 – Ala531) und des äußersten C-Terminus ( $\Delta$ Asn732 – Glu817) haben auf die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung dagegen keinen Effekt (Girrbach *et al.*, 2000).



**Abb. 3-13: Pmt1p Topologiemodell.** Die Deletionskonstrukte Loop 1 ( $\Delta$ 76-124), TM III und IV ( $\Delta$ 161-211), Loop 4 ( $\Delta$ 203-259) und Loop 5 ( $\Delta$ 304-531) sind mit Scheren angedeutet; die C-terminalen Deletionen,  $\Delta$ 617-817 und  $\Delta$ 732-817, mit Pfeilen. Rot hinterlegte Kreise zeigen die in allen Pmtps identischen, und in grau die hoch konservierten Aminosäuren an. N-Glykosylierungsstellen sind mit großen Buchstaben markiert.

Deletionsmutanten die keinen Pmt1p-Pmt2p Komplex ausbilden, sind auch nicht mehr in der Lage im *in vitro* Enzymtest Mannosylreste auf das Akzeptorpeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> zu übertragen (Girrbach *et al.*, 2000). Außerdem werden Pmt1p Substratproteine, wie die Chitinase (Cts1p) (Kuranda und Robbins, 1991; Gentzsch und Tanner, 1997) oder das Hitzeschock-Protein Hsp150p/Pir2p (protein with internal repeats) (Russo *et al.*, 1992; Gentzsch und Tanner, 1997), *in vivo* nicht mehr vollständig mannosyliert. Die gestörte



Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung ist nicht auf Unterschiede in der Proteinexpression und/oder Stabilität bzw. auf größere Veränderungen in der Membrantopologie zurückzuführen (Girrbach *et al.*, 2000). Unklar war jedoch, ob die Pmt1p Deletionskonstrukte nach wie vor korrekt im ER lokalisiert sind, oder ob sie aufgrund der Veränderungen in der Molekülstruktur aus dem ER ausgeschleust werden. Um dies zu klären wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe einer Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt (siehe 2.2.3.9).

Dafür wurden Lysate von *pmt1* Mutanten, welche die entsprechenden Deletionskonstrukte exprimierten, auf einem 11-stufigen Saccharose Dichtegradienten (18 – 60 %) aufgetrennt. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels Western Blot mit anti-HA Antikörpern, die das C-terminale HA-Epitop der Proteine spezifisch erkennen.

**Abb. 3-14:**  
**Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation.**

Die Deletionskonstrukte  $\Delta 617-817$  (pSB64),  $\Delta 304-531$  (pVG13),  $\Delta 203-259$  (pVG11),  $\Delta 161-211$  (pVG9) und  $\Delta 76-124$  (pSB101) wurden in einer *pmt1* Mutante exprimiert. Die Präparation der Lysate und das Auftrennen auf einem 11-stufigen Saccharose Dichtegradienten (18 – 60 %) erfolgte wie unter 2.2.3.9 beschrieben. Pro Fraktion wurden 30  $\mu$ l auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt und über Western Blot analysiert. Der Immunoblot wurde dabei nacheinander mit polyklonalen Antikörpern gegen das vakuoläre Protein Cpy1p, den späten Golgi-Marker Kex2p und die ER-Markerproteine Pmt1p, Pmt2p und Wbp1p dekoriert. Die Detektion des *cis*-Golgi Markers Och1p<sup>HA</sup> und der Pmt1p<sup>HA</sup> Deletionsmutanten erfolgte mit monoklonalen anti-HA Antikörpern.

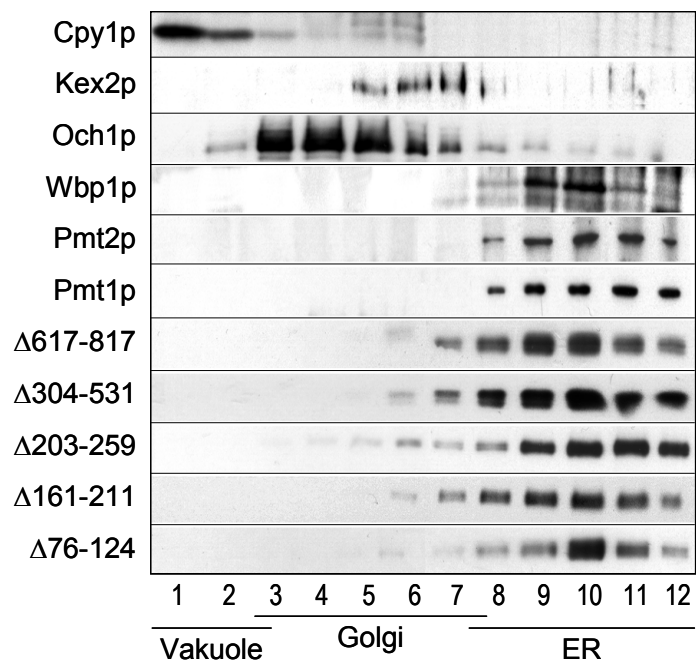


Abbildung 3-14 zeigt, dass alle Deletionsmutanten mit den ER-Markerproteinen Pmt1p, Pmt2p und Wbp1p co-lokalisieren (Spuren 8 – 12). Das ER konnte im Dichtegradient klar von den Golgi- (Abb. 3-14, Spuren 3 – 7) und vakuolären Fraktionen (Abb. 3-14, Spuren 1 und 2) getrennt werden. Als Markerproteine für den Golgi diente die im *cis*-Golgi lokalisierte  $\alpha 1,6$ -Mannosyltransferase Och1p (Nakayama *et al.*, 1992) und die im späten

Golgi lokalisierte Kex2-Protease (Redding *et al.*, 1991). Die vakuolären Fraktionen wurden durch das Markerprotein Carboxypeptidase Y (Cpy1p) (Valls *et al.*, 1987) identifiziert. Somit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Protein/Protein Wechselwirkung mit dem Pmt2p Interaktionspartner nicht auf eine räumliche Trennung zurückzuführen ist.

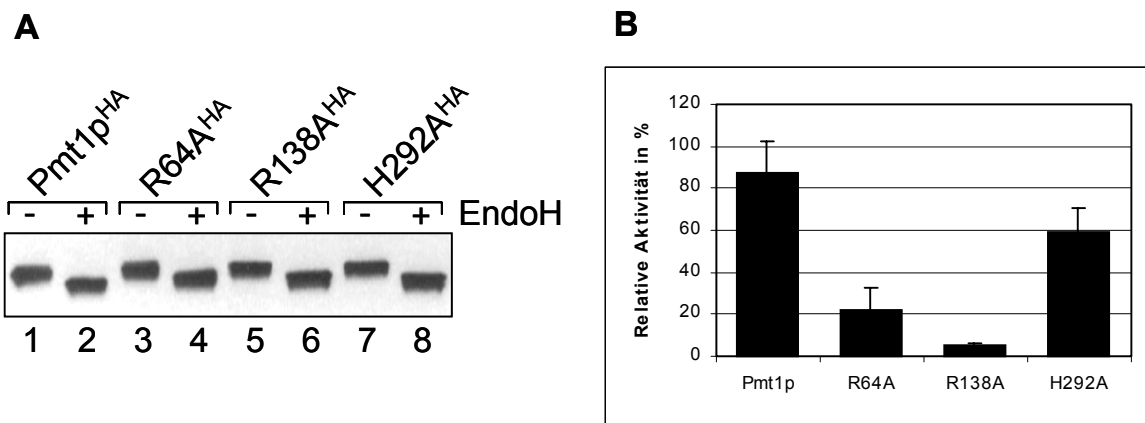
### 3.2.1.2 Pmt1p Punktmutanten

Transmembrandomänen besitzen neben der offensichtlichen Verankerungsfunktion auch eine essentielle Funktion bei der Assemblierung von Proteinkomplexen. Ein Beispiel hierfür ist der in der ER-Membran lokalisierte Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex, der aus neun Membranprotein-Untereinheiten besteht. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Aminosäuren der Transmembranspanne von Ost4p für die Stabilität des Stt3p-Ost4p-Ost3p Subkomplexes entscheidend sind (Kim *et al.*, 2000).

Im Falle des Membranproteins Pmt1p konnte durch die Deletionsmutagenese eine Beteiligung der ins ER-Lumen ragenden Domänen, Asn732 – Glu817 (C-Terminus) und Ser304 – Ala531 (Loop 5), an der Interaktion mit Pmt2p ausgeschlossen werden. Dagegen sind vor allem die N-terminale PMT-Domäne (siehe Abb. 1-3) für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung wichtig. Denkbar wäre, dass die Mannosyltransferase-Komplexe über ihre Transmembrandomänen stabilisiert werden.

Um zu überprüfen, ob für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung bestimmte Aminosäuren in den Membranspannen essentiell sind, wurden in Pmt1p mehrere Aminosäuren gezielt ausgetauscht (siehe 2.2.2.5). Hierfür wurden ausschließlich die in allen PMT-Familienmitgliedern hoch konservierten Aminosäuren Arg64 (TM I), Arg138 (TM II) und His292 (TM V) gegen Ala ausgetauscht (vgl. Abb. 3-13). Die Expression der mit einem HA-Epitop fusionierten Punktmutanten war mit dem wildtypischen Pmt1p<sup>HA</sup> vergleichbar (Abb. 3-15 A, vgl. Spuren 1, 3, 5 und 7). Um auszuschließen, dass die Einführung der Mutationen größere Veränderungen in der Membrantopologie verursachen, wurde die Orientierung der zentralen hydrophilen Domäne und des C-Terminus bestimmt. Pmt1p besitzt drei N-Glykosylierungsstellen – zwei im Loop 5 (Asn 390 und Asn 513) und eine am C-Terminus (Asn 743; vgl. Abb. 3-13) – die *in vivo* genutzt werden (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Durch die Abspaltung der N-gebundenen Oligosaccharide mit

Endoglykosidase H (EndoH), konnte eine Abnahme des Molekulargewichts von 98 auf ~93 kDa beobachtet werden (Abb. 3-15 A, vgl. Spuren 1 und 2). Da die N-Glykosylierungsreaktion ausschließlich im ER-Lumen stattfindet, kann dies als Indikator für die luminale Orientierung der Domänen genutzt werden. Die Pmt1p Punktmutanten zeigten im Immunoblot nach der Behandlung mit EndoH ein mit dem WT-Protein identisches Bandenmuster (Abb. 3-15 A, vgl. Spuren 1 – 8). Somit konnten größere Veränderungen in der Membrantopologie ausgeschlossen werden.



**Abb. 3-15: Charakterisierung der Pmt1p Punktmutanten.** *PMT1<sup>HA</sup>* (pSB56), *R64A<sup>HA</sup>* (pVG19), *R138A<sup>HA</sup>* (pSB114) und *H292A<sup>HA</sup>* (pVG35) wurden einzeln in einem *pmt1* Stamm exprimiert und jeweils Membranen isoliert. (A) *EndoH-Verdau*. 25 µg Membranprotein wurde ohne (-) oder mit (+) EndoH behandelt (siehe 2.2.3.11) und auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die HA-markierten Fusionsproteine wurden im Western Blot mit monoklonalen anti-HA Antikörpern detektiert. (B) *In vitro Mannosyltransferase Aktivität*. Die Übertragung der [<sup>14</sup>C]-Mannose auf das Akzeptorpeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> erfolgte in Gegenwart von jeweils 15 µg Membranprotein. Die Werte wurden gegen die Aktivität einer *pmt1* Mutante, die ein nicht funktionelles Pmt1p exprimiert, korrigiert. Hier sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen gezeigt.

In einem *in vitro* Aktivitätstest sollte geprüft werden, ob die einzelnen Aminosäure-Substitutionen einen Einfluss auf den Mannosyltransfer von Pmt1p haben. Bei diesem Enzymtest wird die Übertragung eines radioaktiv markierten Mannosylrestes von Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man) auf ein Akzeptorpeptid (Acetyl-YATAV-NH<sub>2</sub>) verfolgt. Die Transferaseaktivität ist in *pmt1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um ~98 % reduziert. Fehlt dagegen Pmt2p (*pmt2* Mutante), wird eine minimale Restaktivität von ~10 % erreicht. In der *pmt1pmt2* Doppelmutante ist keine Enzymaktivität nachweisbar (Lussier *et al.*, 1995b). Der Enzymtest ist somit spezifisch für die beiden Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p. Die Restaktivitäten in den *pmt* Einfachmutanten

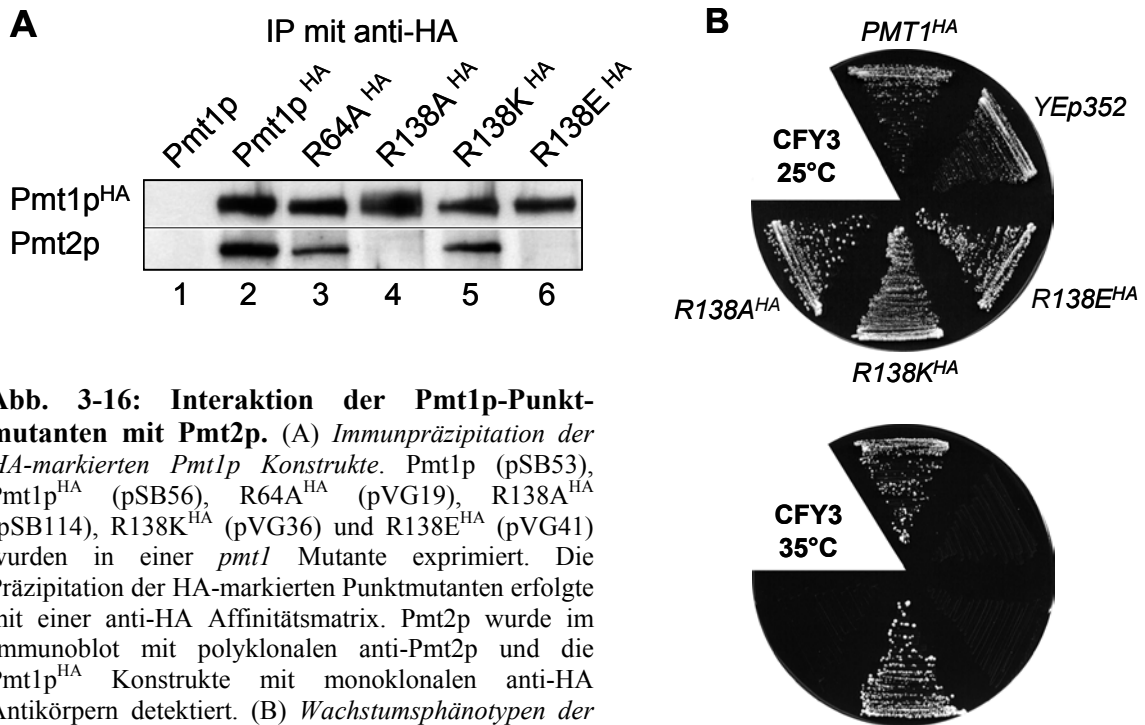
zeigen, dass Pmt1p und Pmt2p ohne den jeweiligen Interaktionspartner eine minimale Aktivität *in vitro* aufweisen. Beide Enzyme besitzen somit für sich genommen Mannosyltransferase-Aktivität. Eine maximale Transferrate wird allerdings nur erreicht, wenn Pmt1p und Pmt2p einen Komplex bilden.

Die einzelnen Aminosäure-Substitutionen hatten auf die *in vitro* Pmt1p-Enzymaktivität unterschiedliche Auswirkungen (Abb. 3-15 B). Am stärksten betroffen war die R138A Mutante, bei der nur noch eine minimale Restaktivität nachgewiesen werden konnte. R64A zeigte eine stark eingeschränkte Transferaseleistung von ~22 % und H292A war zu ~60 % aktiv. Für den drastischen Aktivitätsverlust der R138A Mutante sind zwei Ursachen denkbar. Die mutierten Aminosäuren könnten für die Transferase-Reaktion essentiell sein und/oder die Substitutionen haben einen Einfluss auf die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung. Die zweite Möglichkeit kann mittels einer Co-Immunpräzipitation der mutierten Enzyme überprüft werden.

Die Präzipitation der HA-markierten Proteine erfolgte mit einer monoklonalen anti-HA Affinitätsmatrix wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Es zeigte sich, dass sowohl R64A<sup>HA</sup>, als auch H292A<sup>HA</sup> mit Pmt2p einen Enzymkomplex ausbilden (siehe hierzu Abb. 3-16, Spur 3 und Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, konnte für R138A<sup>HA</sup>, trotz korrekter ER-Lokalisation (Daten nicht gezeigt), keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (siehe hierzu Abb. 3-16, Spur 4). Arg138 ist somit für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung essentiell. Ob diese positiv geladene Aminosäure zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der Pmt1p Mannosyltransferase-Aktivität spielt, ist nicht klar.

Der Arginin zu Alanin Austausch stellt eine drastische Ladungsänderung dar, bei der eine positiv geladene Seitenkette gegen eine neutrale ersetzt wurde. Möglich wäre, dass ausschließlich die positive Ladung an Position 138 für die Pmt1p-Pmt2p Interaktion notwendig ist. Bei einem konservierten Austausch gegen ein positiv geladenes Lysin müsste dann eine Protein/Protein Wechselwirkung wieder möglich sein. Dagegen wäre bei einer R138E Mutante, bei der eine negativ geladene Seitengruppe eingeführt wird, ebenfalls keine Komplexbildung zu erwarten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die entsprechenden Punktmutationen – R138K und R138E – in Pmt1p<sup>HA</sup> eingeführt. Abbildung 3-16 zeigt das Ergebnis einer Co-Immunpräzipitation mit anti-HA Antikörpern. Pmt1p<sup>HA</sup> (Spur 2), R64A<sup>HA</sup> (Spur 3) und R138K<sup>HA</sup> (Spur 5) konnten Pmt2p spezifisch co-präzipitieren; R138A<sup>HA</sup> (Spur 4) und R138E<sup>HA</sup> (Spur 6) waren dazu nicht mehr in der Lage. Zusätzlich konnte im *in vitro* Enzymtest für die R138K<sup>HA</sup> Mutante eine

Transferaseaktivität von 27,4 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Aktivität reichte aus, um den temperatursensitiven Phänotyp einer *pmt1pmt4* Mutante bei restriktiver Temperatur (35°C) zu komplementieren. Dazu waren die Punktmutanten R138A und R138E nicht in der Lage (Abb. 3-16 B). Dies bestätigt die Vermutung, dass eine positive Ladung an Position 138 für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung notwendig ist.

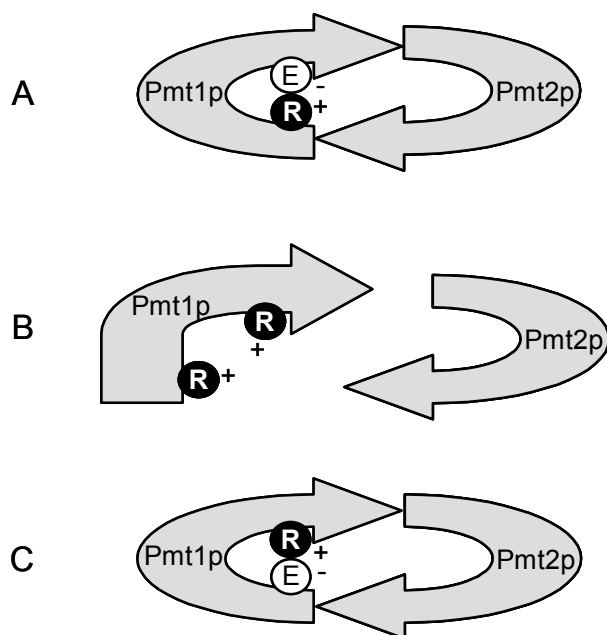


**Abb. 3-16: Interaktion der Pmt1p-Punktmutanten mit Pmt2p.** (A) Immunpräzipitation der HA-markierten Pmt1p Konstrukte. Pmt1p (pSB53), Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56), R64A<sup>HA</sup> (pVG19), R138A<sup>HA</sup> (pSB114), R138K<sup>HA</sup> (pVG36) und R138E<sup>HA</sup> (pVG41) wurden in einer *pmt1* Mutante exprimiert. Die Präzipitation der HA-markierten Punktmutanten erfolgte mit einer anti-HA Affinitätsmatrix. Pmt2p wurde im Immunoblot mit polyklonalen anti-Pmt2p und die Pmt1p<sup>HA</sup> Konstrukte mit monoklonalen anti-HA Antikörpern detektiert. (B) Wachstumsphänotypen der R138A<sup>HA</sup>, R138K<sup>HA</sup> und R138E<sup>HA</sup> Mutanten. Pmt1p<sup>HA</sup>, R138A<sup>HA</sup> und R138K<sup>HA</sup> wurden in dem Hefestamm CFY3 (*pmt1pmt4* Mutante) exprimiert. Die einzelnen Stämme wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und für 2 – 3 Tage bei 25°C bzw. 35°C inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde die *pmt1pmt4* Mutante mit dem leeren Vektor YEp352 transformiert.

Der positiv geladene Argininrest könnte mit einer negativ geladenen Seitengruppe, wie Aspartat oder Glutamat, eine Salzbrücke ausbilden und so zu einer stabilen Bindung beitragen. Arginin gehört neben Leucin zu den Aminosäuren, die sehr häufig an Protein/Protein Interaktionen beteiligt sind (Janin *et al.*, 1988). So wurden elektrostatische Wechselwirkungen durch Arginin bereits für zahlreiche Proteinkomplexe beschrieben (Otzen und Fersht, 1999; Vaughan *et al.*, 1999; Sheinerman und Honig, 2002; Zeng *et al.*, 2002). Für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung wäre ein analoges Prinzip denkbar. Allerdings kann aufgrund der oben gezeigten Mutagenesedaten nicht ausgeschlossen werden, dass der Interaktionsverlust mit Pmt2p einen indirekten Effekt darstellt. Im Falle

des Chymotrypsin Inhibitors 2 (CI2) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass zwei Argininreste für die Ausbildung einer bestimmten Tertiärstruktur notwendig sind. Der Austausch dieser Aminosäuren führte zu einer Strukturänderung, aufgrund derer CI2 nicht mehr an die Protease Subtilisin binden konnte (Otzen und Fersht, 1999). Der Pmt1p Argininrest 138 könnte ebenfalls intramolekular mit Aminosäuren wechselwirken und so eine definierte Struktur für die Interaktion mit Pmt2p bedingen.

Aminosäuren, die miteinander interagieren, können durch eine sogenannte "second-site" Suppressor-Mutagenese identifiziert werden. Das Prinzip beruht darauf, dass ein von einer Mutation verursachter Phänotyp durch eine zweite Mutation unterdrückt bzw. aufgehoben wird. Mit dieser Methode wurden intramolekulare Wechselwirkungen verschiedener Proteine untersucht (Pi *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2002). Um die Hypothese der intramolekularen Wechselwirkung für Pmt1p zu prüfen wurde in der Mannosyltransferase nach konservierten, negativ geladenen Seitengruppen im TM-Bereich gesucht. Glu176 (TM III) und Asp189 (TM IV) könnten solche Partner für eine Ionenbindung darstellen, da sie – genau wie Arg138 – am Übergang der Membranspannen zum ER-Lumen lokalisiert sind (vgl. Abb. 3-13).



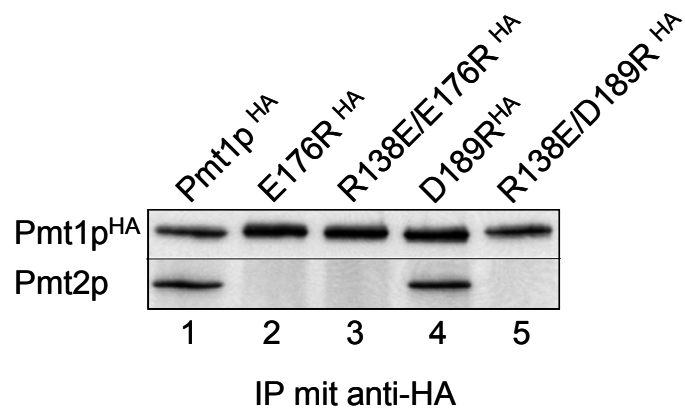
**Abb. 3-17: Modell für eine mögliche Wechselwirkung zwischen Arg138 und Glu176.** Gezeigt ist das Schema nach dem geprüft werden sollte, ob Arg138 (R) intramolekular mit den negativ geladenen Aminosäuren Glu176 (E) bzw. Asp189 (nicht gezeigt) eine Ionenbindung ausbildet. (A) *Wildtypsituation*. Interaktion mit Pmt2p möglich. (B) *E176R Mutante*. Komplexbildung sollte nicht mehr möglich sein. (C) *R138E/E176R Mutante*. Komplexbildung sollte wieder erfolgen. Erklärung siehe Text.

Abbildung 3-17 zeigt modellhaft eine mögliche strukturebende, intramolekulare Ionenbindung zwischen Arg138 und Glu176. Sollte im Wildtyp-Protein eine Salzbrücke zwischen Arg138 und Glu176 ausgebildet werden (Abb. 3-17 A), dann würde man bei einem Austausch des Glutamats gegen Arginin (E176R) erwarten, dass sich die beiden positiv geladenen Aminogruppen abstoßen. Die dadurch veränderte Proteinstruktur würde eine Interaktion mit Pmt2p nicht mehr zulassen (Abb. 3-17 B). Durch den Austausch beider Aminosäuren gegen Aminosäuren entgegengesetzter Ladung – also R138E und E176R – sollte eine elektrostatische Wechselwirkung wieder möglich sein und somit Pmt1p-Pmt2p Komplexe gebildet werden (Abb. 3-17 C). Entsprechend würde man bei der Ausbildung einer Arg138 – Asp189 Salzbrücke erwarten, dass die Punktmutante D189R nicht mehr mit Pmt2p interagiert, R138E/D189R dagegen schon.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die entsprechenden Pmt1p Punktmutanten in einem *pmt1* Stammhintergrund exprimiert und die HA-markierten Proteine mit einer anti-HA Affinitätsmatrix aus den Triton-Extrakten präzipitiert. Wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich, lässt sich im Immunpräzipitat der Mutante E176R<sup>HA</sup> (Spur 2) Pmt2p nicht nachweisen. Daraus folgt, dass das Glutamat an Position 176 für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung essentiell ist (vgl. auch Abb. 3-17 B). Dieser Phänotyp ließ sich durch den zusätzlichen Austausch von R138E nicht komplementieren (Abb. 3-18, Spur 3). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die beiden Arg138 und Glu176 Seitenketten miteinander interagieren. Allerdings kann ein konformationsbedingtes Ausbleiben einer Glu138 – Arg176 Wechselwirkung in der Mutante nicht ausgeschlossen werden.

**Abb. 3-18:**

**Immunpräzipitation der Pmt1p<sup>HA</sup> Punktmutanten.** Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56), E176R<sup>HA</sup> (pVG53), R138E/E176R<sup>HA</sup> (pVG57), D189R<sup>HA</sup> (pVG52) und R138E/D189R<sup>HA</sup> (pVG51) wurden in einem *pmt1* Stammhintergrund exprimiert. Die HA-markierten Proteine wurden mit einer anti-HA Affinitätsmatrix präzipitiert, auf einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Pmt2p wurde mit polyklonalen anti-Pmt2p, die HA-markierten Pmt1p Konstrukte mit monoklonalen anti-HA Antikörpern detektiert.



Die Mutation D189R hatte dagegen keinen Einfluss auf die Pmt1p-Pmt2p Wechselwirkung (Abb. 3-18, Spur 4). Folglich ist der Interaktionsverlust mit Pmt2p bei der R138E/D189R<sup>HA</sup> Doppelmutante allein auf den Arginin-Austausch an Position 138 zurückzuführen (Abb. 3-18, Spur 5).

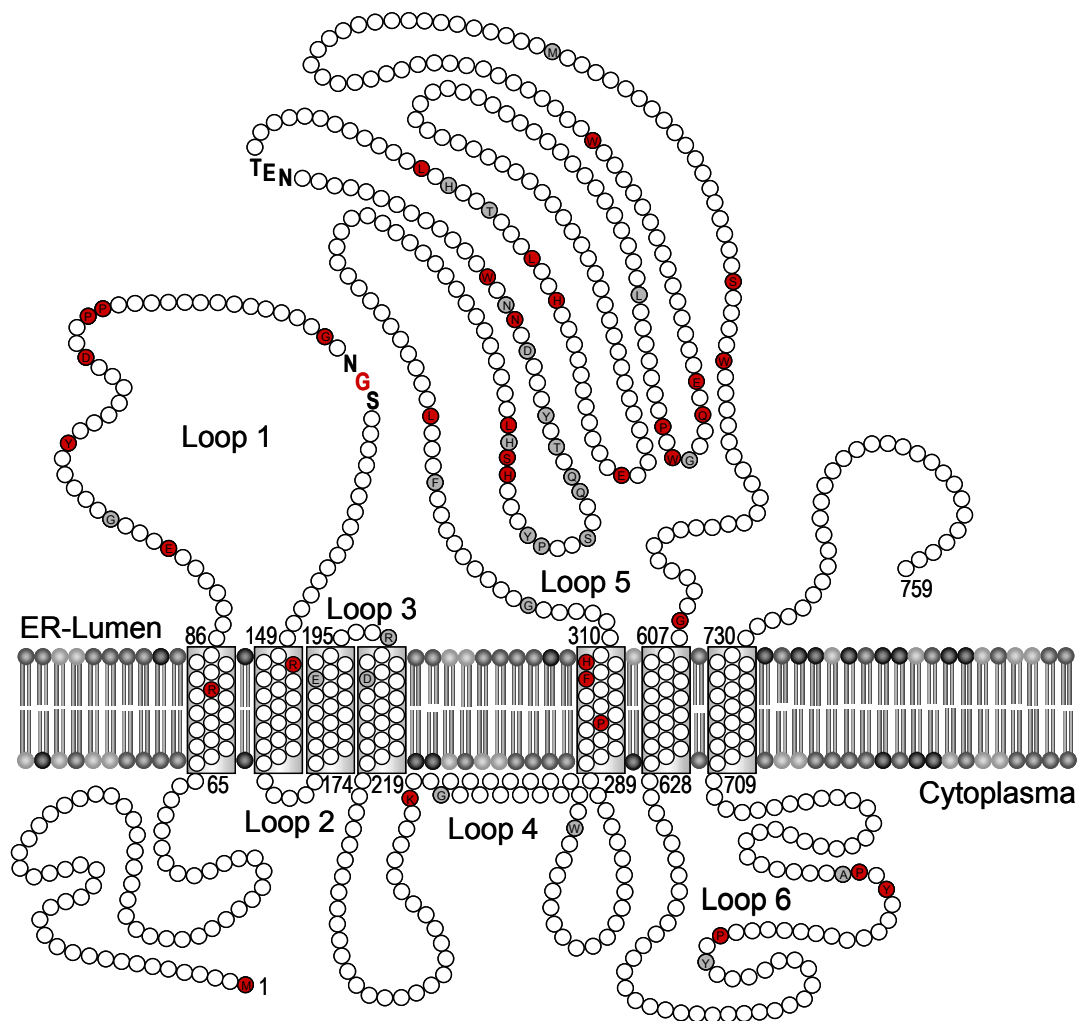
Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Analyse des temperatursensitiven (ts) Wachstumsphänotyps des *pmt1pmt4* Hefestammes. Nach Expression der Pmt1p Punktmutanten war nur das D189R<sup>HA</sup> Konstrukt in der Lage den ts-Phänotyp bei restriktiver Temperatur (35°C) zu komplementieren. *pmt1pmt4* mit E176R<sup>HA</sup>, R138E/E176R<sup>HA</sup> oder R138E/D189R<sup>HA</sup> zeigte bei 35°C kein Wachstum, was auf das Fehlen des Pmt1p-Pmt2p Komplexes *in vivo* und/oder den Verlust der Pmt1p-Enzymaktivität bedingt durch die Aminosäure-Substitution hindeutet (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Aminosäuren Arg138 und Glu176 in den Membranspannen II und III, für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung eine essentielle Rolle spielen. Eine Ionenbindung zwischen diesen Aminosäuren kann durch die Ergebnisse der "second-site" Mutagenese weitgehend ausgeschlossen werden. Möglich wäre allerdings, dass die geladenen Seitenketten in den TMs II und III mit anderen, hier nicht charakterisierten Aminosäuren intramolekular interagieren. Eine zweite Möglichkeit wäre die direkte, also intermolekulare Wechselwirkung mit spezifischen Seitenketten von Pmt2p.

### 3.2.1.3 Pmt2p Punktmutanten

Die geladenen Aminosäuren der ersten vier Pmt1p-Membranspannen sind, wie bereits erwähnt, in allen Pmtps konserviert. Durch den gezielten Austausch der entsprechenden Aminosäuren in Pmt2p sollte geklärt werden, ob diese für eine Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung ebenfalls essentiell sind. Dabei wurden in Pmt2p<sup>HA</sup> die positiven Argininseitenketten in den Transmembranspannen I, II und IV gegen negative Glutamatreste, und ein negatives Glutamat (TM III) bzw. Aspartat (TM IV) gegen Argininreste ersetzt (vgl. Abb. 3-19).

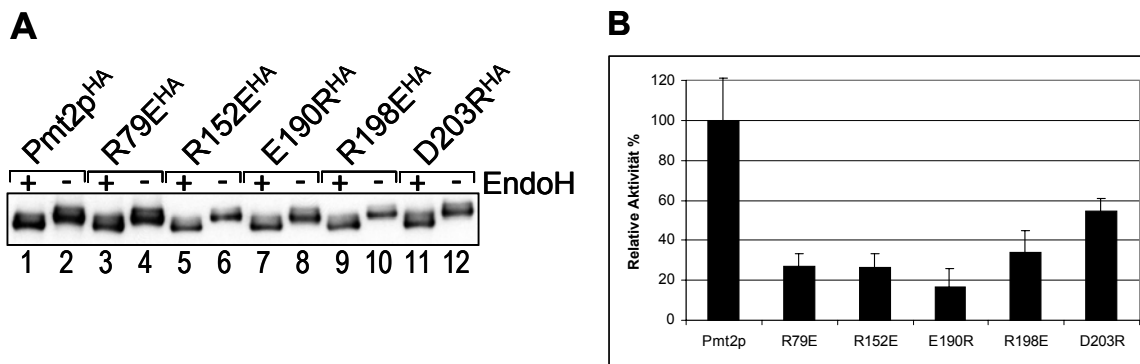




**Abb. 3-19: Pmt2p Topologiemodell.** Die in allen Pmtps identischen Aminosäuren sind in rot, die hoch konservierten in grau hinterlegten Kreisen gezeigt. Putative N-Glykosylierungsstellen wurden mit Großbuchstaben markiert.

Die so erzeugten Pmt2p Punktmutanten R79E<sup>HA</sup>, R152E<sup>HA</sup>, E190R<sup>HA</sup>, R198E<sup>HA</sup> und D203R<sup>HA</sup> wurden in einer *pmt2* Mutante exprimiert. Unterschiede in der Proteinexpression konnten nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Pmt2p besitzt insgesamt zwei putative N-Glykosylierungsstellen, wobei eine in der Loop 1 (Asn131) und eine weitere in der Loop 5 Domäne (Asn404) lokalisiert ist (siehe Abb. 3-19). Um gravierende Änderungen in der Membrantopologie ausschließen zu können wurde zunächst geprüft, ob in Pmt2p die Asn-X-Ser/Thr Konsensussequenzen *in vivo* glykosyliert vorliegen. Hierfür wurden Membranen aus einer Pmt2p<sup>HA</sup> exprimierenden *pmt2* Mutante isoliert, mit EndoH behandelt, die Membranproteine auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt und im

Immunoblot analysiert. Dabei zeigte sich, dass Pmt2p<sup>HA</sup> nach der EndoH-Behandlung ein um ~4 kDa reduziertes, apparentes Molekulargewicht aufweist (Abb. 3-20 A, Spuren 1 und 2). Die Charakterisierung der Punktmutanten mit EndoH ergab keinen Unterschied zum Wildtyp-Protein (Abb. 3-20 A, vgl. Spuren 1 – 12). Damit konnte zum einen gezeigt werden, dass Pmt2p, genau wie Pmt1p, *in vivo* N-glykosyliert vorliegt, und zum anderen die Pmt2p Punktmutanten keine gravierenden Veränderungen in der Membrantopologie aufweisen.



**Abb. 3-20: Charakterisierung der Pmt2p Punktmutanten.** *PMT2<sup>HA</sup>* (pVG80), *R79E<sup>HA</sup>* (pVG81), *R152E<sup>HA</sup>* (pVG82), *E190R<sup>HA</sup>* (pVG84), *R198E<sup>HA</sup>* (pVG83) und *D203R<sup>HA</sup>* (pVG85) wurden einzeln in einem *pmt2* Stamm exprimiert und von den resultierenden Stämmen Membranen isoliert. (A) *EndoH-Verdau*. 25 µg Membranprotein wurde ohne (-) bzw. mit (+) EndoH behandelt (siehe 2.2.3.11) und auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die HA-markierten Fusionsproteine wurden im Western Blot mit monoklonalen anti-HA Antikörpern detektiert. (B) *In vitro Mannosyltransferase Aktivität*. Die Übertragung der [<sup>14</sup>C]-Mannose auf das Akzeptorpeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> erfolgte in Gegenwart von jeweils 25 und 50 µg Membranprotein. Hier sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen gezeigt.

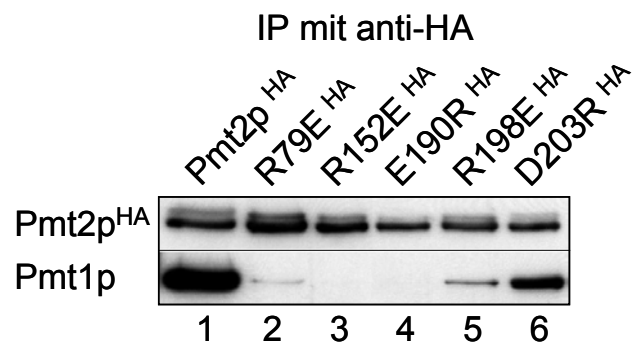
Die *in vitro* Mannosyltransferase-Leistung war bei den Mutanten *R79E<sup>HA</sup>*, *R152E<sup>HA</sup>* und *E190R<sup>HA</sup>* am stärksten beeinträchtigt (Abb. 3-20 B). Etwas weniger stark machte sich der *R198E* und *D203E* Austausch bemerkbar.

Eine Co-Immunpräzipitation sollte klären, ob die einzelnen Punktmutanten noch in der Lage sind, mit Pmt1p zu interagieren. Hierfür wurden Triton-Extrakte der entsprechenden Hefestämme isoliert, daraus die HA-markierten Pmt2p Mutanten mit einer anti-HA Affinitätsmatrix gefällt und die Immunpräzipitate mittels Western Blot analysiert. Aus Abbildung 3-21 ist zu ersehen, dass alle Pmt2p<sup>HA</sup> Mutantenproteine etwa zu gleichen Mengen präzipitiert wurden (vgl. Spuren 1 – 6). Ein völlig anderes Bild ergab sich für die Mannosyltransferase Pmt1p. In den Präzipitaten von *R152E<sup>HA</sup>* (Abb. 3-21, Spur 3) und

E190R<sup>HA</sup> (Abb. 3-21, Spur 4) konnte der Interaktionspartner nicht detektiert werden. Nur nach langer Exposition eines sensitiven Röntgenfilms zeigten sich sehr schwache, Pmt1p-spezifische Signale (nicht gezeigt). Bei den Punktmutanten R79E<sup>HA</sup>, R198E<sup>HA</sup> und D203R<sup>HA</sup> korrelierte die *in vitro* bestimmte Enzymaktivität, mit der Menge an co-präzipitiertem Pmt1p (vgl. Abb. 3-20 B und Abb. 3-21). Die Ergebnisse zeigen, dass die Komplexbildung durch den Austausch dieser Aminosäuren unterschiedlich stark gestört wird. Eine entscheidende Rolle für die Interaktion mit Pmt1p spielen die Aminosäuren Arg152 in TM II und Glu190 in TM III. Somit sind sowohl in Pmt1p, als auch in Pmt2p die entsprechenden homologen funktionellen Gruppen für eine Protein/Protein Wechselwirkung essentiell.

**Abb. 3-21: Immunpräzipitation der Pmt2p<sup>HA</sup> Punktmutanten.**

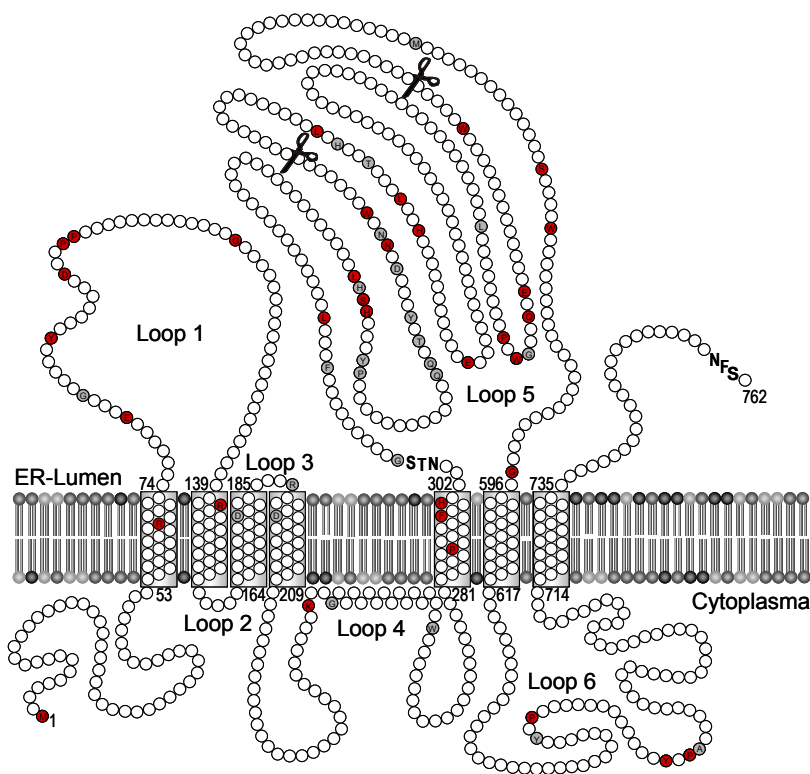
Pmt2p<sup>HA</sup> (pVG80), R79E<sup>HA</sup> (pVG81), R152E<sup>HA</sup> (pVG82), E190R<sup>HA</sup> (pVG84), R198E<sup>HA</sup> (pVG83) und D203R<sup>HA</sup> (pVG85) wurden einzeln in einem *pmt2* Stamm exprimiert. Die HA-markierten Proteine wurden mit einer anti-HA Affinitätsmatrix aus Triton-Extrakten präzipitiert, auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Pmt1p und Pmt2p wurden mit den entsprechenden polyklonalen Antikörpern detektiert.



In einem zukünftigen Projekt soll geprüft werden, ob zwischen den Aminosäuren Pmt1p Arg138 und Pmt2p Glu190 bzw. Pmt1p Glu176 und Pmt2p Arg152 intermolekulare Ionenbindungen ausgebildet werden. Dies kann, genau wie unter 3.2.1.2 beschrieben, mittels "second-site" Suppressor-Mutanten untersucht werden. Dazu werden die einzelnen Punktmutanten Pmt1p R138E – Pmt2p E190R und Pmt1p E176R – Pmt2p R152E in Hefe co-exprimiert. Durch Co-Immunpräzipitationen soll ermittelt werden, ob die Pmt1p- und Pmt2p-Punktmutanten miteinander wechselwirken.

### 3.2.2 Charakterisierung der Pmt4p-Pmt4p Komplexbildung

Pmt4p lässt sich von den anderen Mannosyltransferasen in *S. cerevisiae* in mehrfacher Hinsicht abgrenzen. Erstens zeigen phylogenetische Analysen aller bisher identifizierten PMTs, dass Pmt4p einer eigenen Subfamilie zugeordnet werden kann (Willer *et al.*, 2002). Zweitens ist Pmt4p in der Hefe nicht redundant; das Enzym ist also der einzige Vertreter seiner Subfamilie. Drittens zeigt ein Vergleich der Loop 5 Domänen aller Pmtps, dass Mitglieder der *PMT4* Subfamilie signifikante Unterschiede in den konservierten Motiven A – C aufweisen (siehe dazu 3.3.1 und Anhang I). Viertens werden viele Proteinsubstrate ausschließlich von Pmt4p mannosyliert (Gentzsch und Tanner, 1997) und fünftens bildet ausschließlich Pmt4p homomere Proteinkomplexe aus (3.1.3.2).



**Abb. 3-22: Pmt4p Topologiemodell.** Die in allen Pmtps identischen Aminosäuren sind in rot, die hoch konservierten in grau hinterlegten Kreisen gezeigt. Putative N-Glykosylierungsstellen sind mit Großbuchstaben und der deletierte Bereich ist mit Scheren markiert.

Für die Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p konnte gezeigt werden, dass an der Protein/Protein Wechselwirkung die gleichen konservierten Proteindomänen beteiligt sind (3.2.1), und dass die Pmt1p Loop 5 Domäne für die Mannosyltransferase-Aktivität essentiell ist (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Es stellt sich die Frage, ob für Pmt4p,

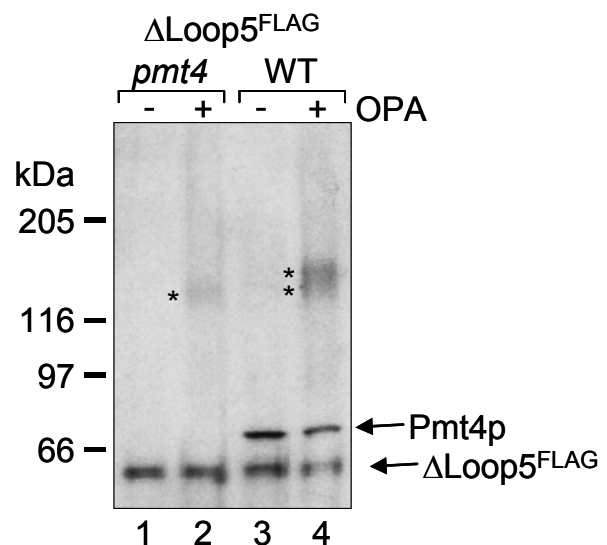
trotz aller Unterschiede, ähnliche Interaktions- und Funktionsmechanismen zugrunde liegen.

Um zu prüfen, ob die große hydrophile Domäne (Loop 5) von Pmt4p für die Mannosyltransferase-Reaktion und/oder Homomerbildung essentiell ist, wurde dieser Bereich von Ser394 bis Ile521 deletiert (Pmt4p  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup>, Abb. 3-22).

Das mit vier FLAG-Epitopen markierte  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> Konstrukt wurde im Wildtyp Stamm und in einer *pmt4* Mutante exprimiert. Der Nachweis einer Komplexbildung erfolgte durch chemisches Quervernetzen der Membranproteine. Abbildung 3-23 zeigt, dass nach Zugabe des Quervernetzers OPA, neben dem monomeren  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup>, auch hochmolekulare Proteinkomplexe mit einem apparenten Molekulargewicht von ~140 kDa detektiert werden konnten (vgl. Spuren 1 und 2). Bei gleichzeitiger Expression von  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> und Pmt4p in Wildtyp-Zellen, entstanden nach Zugabe von OPA, Komplexe mit unterschiedlichem Molekulargewicht von ~156 kDa bis ~170 kDa (Abb. 3-24, Spuren 3 und 4).

**Abb. 3-23:**

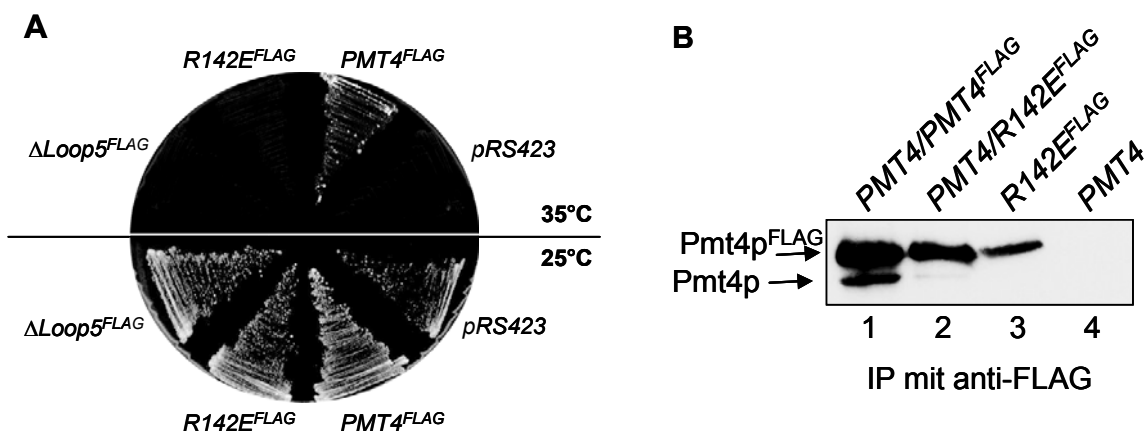
**Chemische Quervernetzung von Pmt4p  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup>.** Pmt4p  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> (pVG37) wurde im Wildtyp (WT) und in der *pmt4* Mutante exprimiert. Die chemische Quervernetzung erfolgte wie unter 2.2.3.8 beschrieben mit 75  $\mu$ M OPA (+) oder ohne OPA (-). Die Proteine wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Pmt4p Antikörpern inkubiert. (\*) zeigt die Pmt4p-spezifischen Proteinkomplexe.



Daraus kann gefolgert werden, dass  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> sowohl mit sich selbst, als auch mit Pmt4p interagiert. Dagegen kann der Wachstumsdefekt einer temperatursensitiven *pmt1pmt4* Mutante bei restriktiver Temperatur (35°C) durch die Expression des Pmt4p  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> Konstrukts nicht komplementiert werden (Abb. 3-24 A). Die zentrale, hydrophile Domäne ist für die Pmt4p Mannosyltransferase-Aktivität also essentiell. Die

Daten zeigen, dass die Loop 5 Domäne von Pmt4p ähnliche Eigenschaften hat, wie die Loop 5 Domäne von Pmt1p.

Der gezielte Austausch von Arginin 142 (TM II) von Pmt4p gegen Glutamat sollte klären, ob diese konservierte Aminosäure für eine Homodimer-Bildung benötigt wird. Diese Aminosäure wurde ausgewählt, da die Veränderung der entsprechenden Seitenketten in Pmt1p (R138E) und Pmt2p (R152E), zum Verlust des Interaktionspartners führte. Abbildung 3-24 A zeigt, dass das mutierte Protein R142E<sup>FLAG</sup> nicht in der Lage war, den temperatursensitiven Wachstumsphänotyp der *pmt1pmt4* Mutante bei restriktiver Temperatur (35°C) zu komplementieren. Dies kann bedeuten, dass Arg142 eine wichtige Funktion bei der Transferase-Reaktion übernimmt und/oder eine entscheidende Rolle bei der Pmt4p-Pmt4p Komplexbildung spielt.



**Abb. 3-24: Charakterisierung der Pmt4p  $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup> und R142E<sup>FLAG</sup> Mutanten.** (A) Bestimmung des Wachstumsphänotyps. Die temperatursensitive *pmt1pmt4* Mutanten (CFY3) wurde mit den Plasmiden pRS423 (leerer Vektor), pJK4-B1 (*PMT4<sup>FLAG</sup>*/pRS423), pVG45 (*PMT4 R142E<sup>FLAG</sup>*/pRS423) und pVG37 (*PMT4 $\Delta$ Loop5<sup>FLAG</sup>*/pRS423) transformiert. Der Wachstumsphänotyp wurde auf YPD-Platten bei 25°C bzw. 35°C (3 Tage Inkubation) bestimmt. (B) Immunpräzipitation von *R142E<sup>FLAG</sup>*. Die Expression von *Pmt4p<sup>FLAG</sup>* und *R142E<sup>FLAG</sup>* erfolgte im Wildtyp-Stamm (Spuren 1 und 2). Als Kontrolle diente eine *R142E<sup>FLAG</sup>* exprimierende *pmt4* Mutante (Spur 3) und der Wildtyp mit leerem Vektor (*PMT4*, Spur 4). Die FLAG-markierten Proteine wurden mit einer anti-FLAG Affinitätsmatrix aus Triton-Extrakten gefällt. Der Nachweis von Pmt4p erfolgte mit polyklonalen anti-Pmt4p Antikörpern.

Um zu prüfen, ob Arg142 für die Protein/Protein Interaktion essentiell ist, wurde *Pmt4p<sup>FLAG</sup>* und die *R142E<sup>FLAG</sup>* Punktmutante im Wildtyp und als Kontrolle zusätzlich *R142E<sup>FLAG</sup>* in einer *pmt4* Mutante exprimiert. Die Immunpräzipitation aus den entsprechenden Triton-Extrakten erfolgte mit einer monoklonalen anti-FLAG

Affinitätsmatrix. Die Präzipitate wurden im Immunoblot mit polyklonalen anti-Pmt4p Antikörpern analysiert. Pmt4p<sup>FLAG</sup> konnte das im WT exprimierte Pmt4p effizient co-präzipitieren (Abb. 3-24 B, Spur 1). Im Gegensatz dazu wurden im Präzipitat der Punktmutante R142E<sup>FLAG</sup> nur minimale Pmt4p Spuren detektiert (Abb. 3-24 B, vgl. Spuren 1 und 2). Dies zeigt, dass Arg142 bei der Pmt4p-Pmt4p Komplexbildung eine kritische Rolle spielt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die Interaktion heteromerer Pmt1p-Pmt2p, als auch homomerer Pmt4p-Pmt4p Komplexe nach einem ähnlichen Prinzip erfolgt. Zusätzlich konnte für Pmt4p gezeigt werden, dass die hydrophile Loop 5 Domäne – analog zu Pmt1p – für die Funktion des Enzyms essentiell ist.

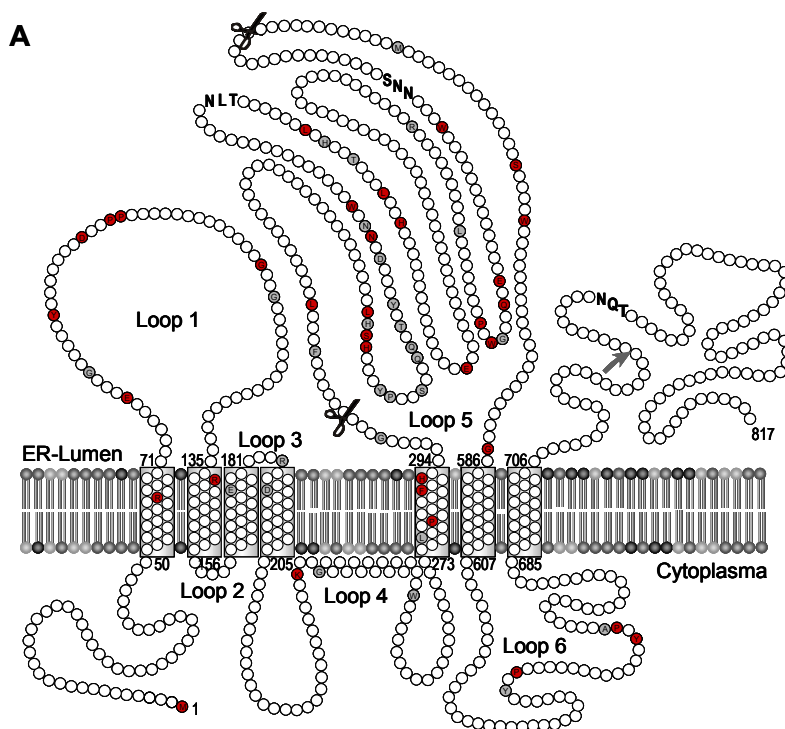
### 3.3 PMT1 FUNKTIONSANALYSE

Glykosyltransferasen, katalysieren die Synthese von Glykokonjugaten (einschließlich Glykolipiden, Glykoproteinen und Polysacchariden), indem sie ein aktiviertes Mono- oder Oligosaccharid auf ein bestimmtes Akzeptormolekül übertragen. Da die Glykosylierungsreaktion in Bezug auf die anomere Konfiguration des Zuckers und das Substrat hoch spezifisch ist, kann man davon ausgehen, dass im Enzym spezifische Domänen für die Zuckerbindung und Substraterkennung vorliegen. Mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese können einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die an der Katalyse und/oder Substraterkennung beteiligt sind (Ly und Withers, 1999; Peracchi, 2001).

#### 3.3.1 Charakterisierung der Pmt1p Punktmutanten

Die Deletionsmutagenese an Pmt1p zeigt, dass die C-terminale Domäne (Asn732 bis Glu817) an der Transferasereaktion nicht beteiligt ist (siehe Abb. 3-25 A). Der Verlust des luminal orientierten Loop 5, führt dagegen zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass diese Domäne für die Übertragungsreaktion essentiell ist (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Da alle

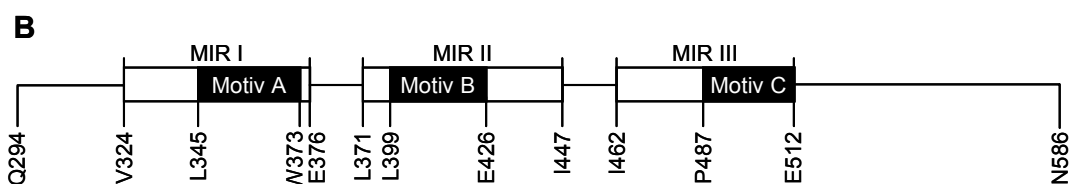
Mitglieder dieser Enzymfamilie den Transfer einer Mannose von Dol-P-Man auf Proteinsubstrate katalysieren, sollten funktionell wichtige Gruppen bei allen Pmtps konserviert sein. Durch den Vergleich der luminalen Loop 5 Polypeptidsequenz von Pmt1p mit anderen Mannosyltransferasen (Thompson *et al.*, 1994) aus *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* und Mensch, konnten zahlreiche Aminosäuren identifiziert werden, die innerhalb der PMT-Familie identisch sind (Girrbach *et al.*, 2000). Diese konservierten Aminosäuren der Loop 5 Domäne sind zum größten Teil in drei Konsensusmotiven gruppiert, die in allen Protein O-Mannosyltransferasen zu finden sind: Motiv A (Aminosäuren (AS) 345 – 373) mit der Konsensussequenz LHSHx<sub>3</sub>YPx<sub>2</sub>-<sub>9</sub>SxqQQ(V/I)TxYxDxNNxW, Motiv B (AS 399 – 426) LxHx<sub>2</sub>Tx<sub>3</sub>Lx<sub>2</sub>H(d/e)vx<sub>2</sub>pxsx<sub>4-7</sub>E und Motiv C (AS 487 – 512) mit der Sequenz P(d/e)WgFxQxE(V/I)x<sub>10-12</sub>txWx(V/I)E (Großbuchstaben symbolisieren > 90 % und Kleinbuchstaben > 50 % Konservierung; siehe Abb. 3-25 und Anhang I).



**Abb. 3-25: Pmt1p Domänenstruktur.** (A)

*Pmt1p* Topologiemoell. Die Deletionen  $\Delta$ Loop5 ( $\Delta$ 304-531) und  $\Delta$ 732-817 sind mit Scheren, bzw. einem Pfeil angedeutet. Rot hinterlegte Kreise zeigen die in allen Pmtps identischen, und in grau die hoch konservierten Aminosäuren an. N-Glykosylierungsstellen sind mit Großbuchstaben markiert.

(B) *Loop 5* Konsensussequenz-Motive. Motiv A – C siehe Text. Die zu Mannosyltransferasen,  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren und  $\text{Ry}$ -Rezeptoren homologen Abschnitte sind mit MIR bezeichnet.



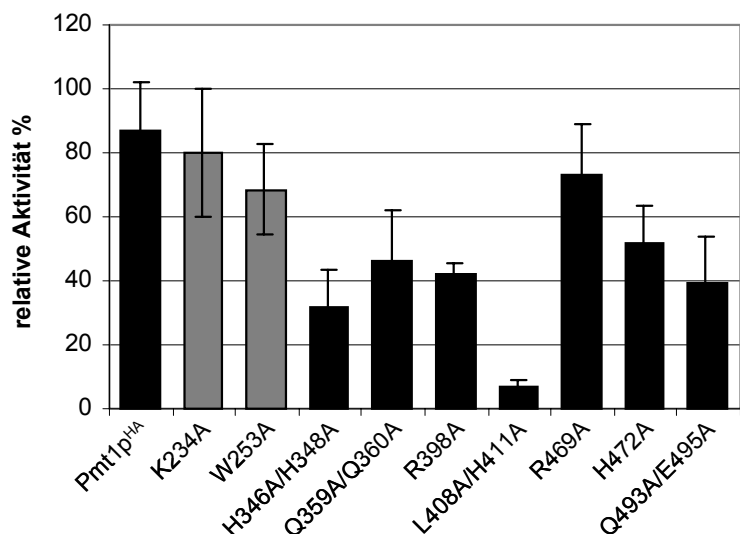


Die Mitglieder der PMT-Familie besitzen in der Loop 5 Domäne jeweils drei Sequenzabschnitte, die zu Inositol-Triphosphat Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR) homolog sind (siehe Einleitung 1.1.1.2) (Ponting, 2000). Diese Bereiche, werden als MIR-Domänen (Protein O-Mannosyltransferase, IP<sub>3</sub>-Rezeptor, Ry-Rezeptor) bezeichnet (Abb. 3-25 B). Interessant ist, dass die Sequenzmotive A – C innerhalb dieser MIR-Domänen liegen. Welche Funktion diese homologen Bereiche in den IP<sub>3</sub>- und Ry-Rezeptoren haben, ist nicht bekannt.

Weitere identische bzw. hoch konservierte Aminosäuren wurden vorwiegend in den Membranspannen I – V (PMT-Domäne) und in den Loopregionen 1, 4 und 6 der Mannosyltransferasen identifiziert (Abb. 3-25 A).

Basierend auf den Pmtp-Sequenzvergleichen erfolgte an Pmt1p<sup>HA</sup> als Modellprotein, der gezielte Austausch konservierter Aminosäuren gegen Alanin (Girrbach *et al.*, 2000). Ziel war es, die Bedeutung konservierter Aminosäuren für die Enzymfunktion zu untersuchen. Dabei wurden Einzel- und Doppelsubstitutionen innerhalb des cytoplasmatisch orientierten Loop 4 und dem luminal exponierten Loop 5 vorgenommen. Im *in vitro* Enzymtest wurde die Mannosyltransferase-Aktivität der Punktmutanten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26 zusammengefasst. Der größte Teil der Mutationen führt zu keinem drastischen Aktivitätsverlust, was zeigt, dass die vorgenommenen Veränderungen weitgehend toleriert werden. Einen dramatischen Aktivitätsverlust von ~93 % ist nur bei der Doppelmutante L408A/H411A zu beobachten. Die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung ist hier jedoch nicht beeinflusst. Beide Aminosäuren sind im konservierten Motiv B (Loop 5) lokalisiert.

**Abb. 3-26: *In vitro* Enzymaktivität der Pmt1p Punktmutanten.** Nach Zeller, Diplomarbeit 1999. Die grauen Balken markieren die im cytoplasmatisch orientierten Loop 4 lokalisierten Aminosäuren. Die restlichen Punktmutanten betreffen den luminalen Loop 5.

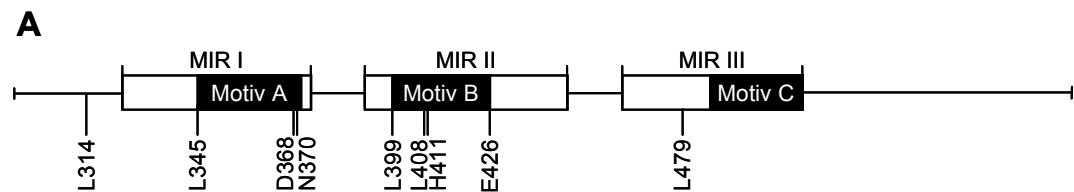


Um zu klären, welche Aminosäure diesen drastischen Aktivitätsverlust verursacht, und um einen additiven Effekt auszuschließen, wurden in einer weiteren Mutagenese die funktionellen Gruppen einzeln ausgetauscht. Die Expression der Punktmutanten L408A<sup>HA</sup> und H411A<sup>HA</sup> erfolgte in einem *pmt1* Stammhintergrund. Im *in vitro* Enzymtest konnte gezeigt werden, dass der H411A<sup>HA</sup> Austausch nur einen minimalen Effekt auf die Transferaseaktivität hat (Restaktivität 81,8 %). Im Gegensatz dazu ging die Aktivität der L408A<sup>HA</sup> Mutante auf 14,5 % zurück (siehe dazu Abb. 3-27 B). Dieser Aktivitätsverlust war weder auf eine Mislokalisierung des Proteins, noch auf eine gestörte Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit gezeigt werden, dass Leucin 408 für die Funktionalität der Mannosyltransferase eine wichtige Rolle spielt.

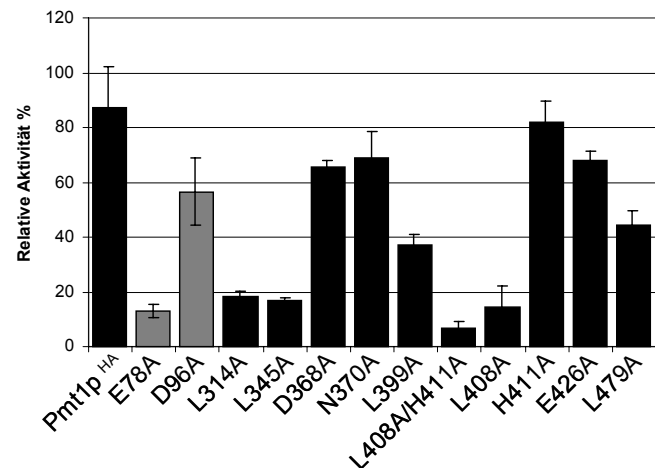
Da in der Loop 5 Domäne mehrere Leucinreste konserviert sind (Leu315, Leu345, Leu399 und Leu479) sollte durch den gezielten Austausch gegen Alanin getestet werden, ob diese ebenfalls einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Zusätzlich wurden konservierte, negativ geladene Aminosäuren in Loop 1 (Glu78, Asp96) und 5 (Asp368, Glu426) für eine Mutagenese ausgewählt, da Glykosyltransferasen und Glykosidasen häufig negative Seitengruppen für den Reaktionsmechanismus benötigen (siehe Einleitung 1.2.2) (Sinnot, 1990; Ly und Withers, 1999; Ünligil und Rini, 2000). Eine weitere Mutation wurde an Position 370 in Motiv A eingeführt (N370A). Die relativen Positionen der einzelnen Punktmutationen innerhalb des Loop 5 sind in Abbildung 3-27 A gezeigt.

Die eingeführten Substitutionen hatten weder Einfluss auf die Expression, noch auf die Membrantopologie. Zudem waren alle Punktmutanten in der Lage, mit Pmt2p zu interagieren (Daten nicht gezeigt). Bei der Bestimmung der Enzymaktivität zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede (Abb. 3-27 B).

Die negativ geladenen Aminosäurereste Asp96 (Loop 1), Asp368 und Glu426 (Loop 5) sind für die Transferasereaktion nicht essentiell, da die Substitutionen durch Alanin nur einen mäßigen Rückgang der Aktivität auf ~60 – 70 % verursachten. Dagegen zeigte die Punktmutation E78A in Loop 1 nur noch eine geringe Restaktivität von 13 %. Bei den Leucin-Mutanten L314A, L345A konnte ebenfalls ein deutlicher Aktivitätsverlust von 82 bzw. 84 % beobachtet werden. L399A und L479A waren noch zu ~40 % aktiv (Abb. 3-27 B). Die Punktmutante N370A zeigte einen moderaten Rückgang der Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 3-27 B).



**B**



**Abb. 3-27: *In vitro* Transferase-Aktivität der Pmt1p Punktmutanten.**

(A) Domänenstruktur des Pmt1p Loop 5. Die relativen Positionen der in der Mutagenese ausgetauschten AS sind angezeigt.

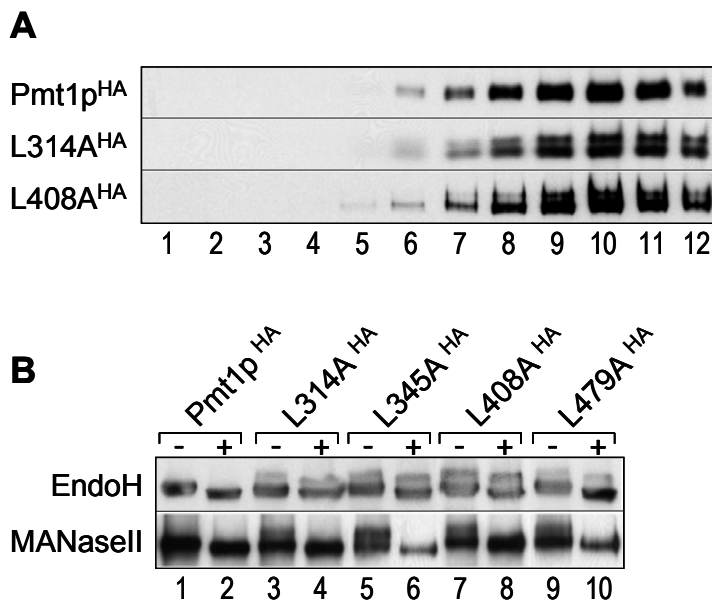
(B) *In vitro* Enzymaktivität. Es wurden Membranen von *pmt1* Stämmen, die Pmt1p<sup>HA</sup>, E78A<sup>HA</sup>, D96A<sup>HA</sup>, L314A<sup>HA</sup>, L345A<sup>HA</sup>, D368A<sup>HA</sup>, N370A<sup>HA</sup>, L399A<sup>HA</sup>, L408A/H411A<sup>HA</sup>, L408A<sup>HA</sup>, H411A<sup>HA</sup>, E426A<sup>HA</sup> und L479A<sup>HA</sup> exprimierten, isoliert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit 15 µg Membranprotein und Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> als Akzeptorpeptid. Die Werte wurden gegen die Aktivität einer *pmt1* Mutante, welche ein nicht funktionelles Pmt1p exprimiert, korrigiert. Hier sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen gezeigt. Die den Loop 1 betreffenden Punktmutanten sind mit grauen Balken markiert.

Obwohl viele Substitutionen toleriert werden, ist es hier gelungen, zusätzlich zur L408A Mutante, drei weitere Punktmutanten zu identifizieren, die nur noch minimale Restaktivitäten aufweisen. Die funktionellen Gruppen der Aminosäuren Glu78 (Loop 1), Leu314, Leu345 und Leu408 (Loop 5) sind für eine effiziente Transferaseleistung von Pmt1p essentiell. Die anderen, in der Mutagenese charakterisierten Aminosäuren, spielen bei der Transferasereaktion vermutlich keine entscheidende Rolle.

### 3.3.1.1 Charakterisierung der Leucin-Mutanten

Bei der Charakterisierung der Pmt1p Punktmutanten fiel auf, dass die vier mutierten Proteine L314A<sup>HA</sup>, L345A<sup>HA</sup>, L408A<sup>HA</sup> und L479A<sup>HA</sup> im SDS-Polyacrylamidgel mit zwei unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten auftrennen. Eine prominente Bande zeigte das selbe Laufverhalten wie das Wildtyp-Pmt1p<sup>HA</sup> (98 kDa). Bei einem apparenten Molekulargewicht von ~103 kDa konnte eine zweite, etwas schwächere Bande detektiert

werden (Abb. 3-28 A und B). Um zu prüfen, ob beide Formen im ER lokalisiert sind, wurde mit den beiden L314A<sup>HA</sup> und L408A<sup>HA</sup> Mutanten eine Zellfraktionierung über einen Saccharose Dichtegradienten durchgeführt. Aus Abbildung 3-28 A geht hervor, dass die unterschiedlichen Proteinformen co-lokalisieren (Spuren 6 – 12). Sowohl Pmt1p<sup>HA</sup>, als auch die Leucin-Mutanten wurden in den Fraktionen 6 – 12 angereichert, wobei die stärkste Proteinanreicherung jeweils in den Fraktionen 9 – 11 zu finden war. Dies bestätigt die korrekte ER-Lokalisation der mutierten Enzyme (vgl. Ergebnisse in Abb. 3-14).



**Abb. 3-28:**

**Charakterisierung der Leu-Mutanten.**

(A) Zellfraktionierung über einen Saccharose Dichtegradienten. Die Expression von Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56), L314A<sup>HA</sup> (pVG32) und L408A<sup>HA</sup> (pSB108) erfolgte in einem *pmt1* Stammhintergrund. Die Fraktionierung erfolgte wie unter 2.2.3.9 beschrieben. Von jeder Fraktion wurden 30 µl Aliquots auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die HA-markierten Proteine wurden mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen. (B) Abspaltung N- und O-gebundener Zucker mit Endoglykosidase H (EndoH) bzw. α1-2,3,6-Mannosidase

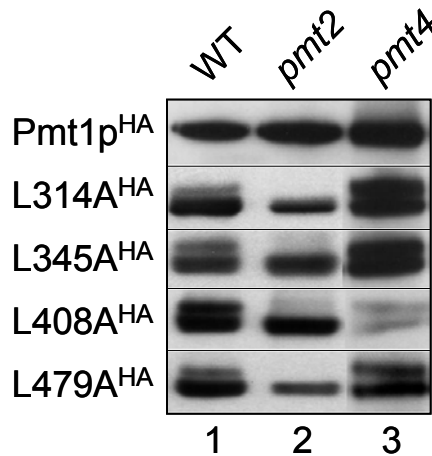
(MANaseII). Die Abspaltung der Zucker erfolgte wie unter 2.2.3.11 beschrieben. Die Proben wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die HA-markierten Proteine wurden mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen.

Das unterschiedliche Laufverhalten könnte auf eine zusätzliche Proteinmodifikation zurückzuführen sein. Denkbar wären hier veränderte N-Glykosylierungsmuster, Modifikationen durch O-gebundene Zucker oder durch Phosphorylierungen. Zunächst wurde die erste Möglichkeit geprüft, indem alle N-gebundenen Oligosaccharide mit Hilfe der Endoglykosidase H (EndoH) entfernt wurden. Abbildung 3-28 B zeigt, dass sowohl Pmt1p<sup>HA</sup>, als auch die Punktmutanten nach der Inkubation mit EndoH ein schnelleres Laufverhalten im SDS-Gel aufwiesen (vgl. Spuren 1 – 10). Dies ist auf das Entfernen der drei N-gebundenen Oligosaccharide an Asn390, Asn513 und Asn743 zurückzuführen (vgl. Abb. 3-25 A). Das Laufverhalten der größeren Proteinform änderte sich nach der EndoH

Behandlung um denselben Betrag (Abb. 3-28 B, Spuren 4, 6, 8 und 10). Eine Abnahme des MG auf die vollständig deglykosylierte Wildtypform konnte allerdings nicht beobachtet werden. Daraus folgt, dass das unterschiedliche Laufverhalten dieser mutierten Proteine nicht auf eine Modifikation durch N-gebundene Zucker zurückzuführen ist.

Durch die Behandlung mit einer  $\alpha$ 1-2,3,6-Mannosidase (MANaseII) (Snaith, 1975) sollte geklärt werden, ob die mutierten Proteine O-mannosyliert vorliegen. Um sicherzustellen, dass MANaseII O-gebundene Zucker von Proteinen abspalten kann, wurde zunächst eine Methode mit dem O-mannosylierten Zellwandprotein  $\alpha$ -Agglutinin (Aga2p) (Watzel *et al.*, 1988) aus *S. cerevisiae* als Modellprotein etabliert. Das Protein wurde aus Hefezellen gereinigt (2.2.3.10) und mit Mannosidase inkubiert. Es zeigte sich, dass das Protein stark angereichert vorliegen muss, um die Mannosen abspalten zu können (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Pmt1p Punktmutanten vor der Inkubation mit MANaseII immunpräzipitiert, um störende Verunreinigungen zu vermeiden. Abbildung 3-28 B zeigt das Ergebnis der MANaseII Behandlung. Nach Inkubation mit Mannosidase konnte beim Wildtyp-Protein Pmt1p<sup>HA</sup> eine minimale Abnahme im Molekulargewicht beobachtet werden (vgl. Spuren 1 und 2). Dies ist auch zu erwarten, da N-gebundene Oligosaccharide ebenfalls  $\alpha$ 1-2,3,6-Mannosen aufweisen, die von der Glykosidase abgespaltet werden. Die zweite Proteinform der Punktmutanten L314A<sup>HA</sup>, L345A<sup>HA</sup>, L408A<sup>HA</sup> und L479A<sup>HA</sup> war nach dem Verdau mit MANaseII nicht mehr nachweisbar (Abb. 3-28 B, vgl. Spuren 3 – 10). Dies zeigt, dass ein Teil der rekombinanten Proteine O-gebundene Mannosen tragen und so das unterschiedliche Laufverhalten bedingen.

Welche der sechs Mannosyltransferasen für die Modifikation verantwortlich ist, sollte durch die Expression der Leucin-Mutanten in verschiedenen *pmt* Stämmen untersucht werden. Um zu testen, ob Pmt2p oder Pmt4p an der Mannosylierung beteiligt sind, wurden die mutierten Pmt1p-Konstrukte in *pmt1pmt2* und *pmt1pmt4* Mutanten exprimiert. Fehlt die verantwortliche Mannosyltransferase, sollte die 103 kDa Form nicht mehr auftreten. Dies ist im *pmt2* Stammhintergrund zu beobachten (Abb. 3-29, Spur 2), während im WT und *pmt4* Hintergrund beide Proteinformen vorhanden sind (Spuren 1 und 3).



**Abb. 3-29: Analyse der Leucin-Mutanten in verschiedenen *pmt* Stämmen.** Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56), L314A<sup>HA</sup> (pVG32), L345A<sup>HA</sup> (pVG31), L408A<sup>HA</sup> (pSB108) und L479A<sup>HA</sup> (pVG30) wurden in den Hefestämmen *pmt1* (WT), *pmt1pmt2* (*pmt2*) und *pmt1pmt4* (*pmt4*) exprimiert. Für die Analyse wurden jeweils 25 µg Membranprotein auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die HA-markierten Proteine im Immunoblot mit monoklonalen anti-HA Antikörpern detektiert.

Ein Teil der mutierten Pmt1p Enzyme wird somit spezifisch von Pmt2p O-mannosyliert. Ob die Modifikationen einen Einfluss auf die Mannosyltransferase-Aktivität haben, kann nicht beantwortet werden. Da allerdings ein großer Teil der mutierten Proteine nicht mannosyliert wird, ist ein modifikationsbedingter Rückgang in der beobachteten Transferaseleistung unwahrscheinlich.

### 3.3.2 Untersuchungen zur Bindung eines Peptidsubstrats an Pmt1p

Protein O-Mannosyltransferasen stellen, wie bereits erwähnt ein mögliches Ziel für die Entwicklung von Fungiziden dar, um beispielsweise phytopathogene Pilze bekämpfen zu können. Aus diesem Grund ist es wichtig, die molekularen Mechanismen der Mannosyltransferase-Reaktion zu verstehen. Dies schließt die Identifizierung der Bindestellen für das Donormolekül Dol-P-Man und das Akzeptorpeptid mit ein.

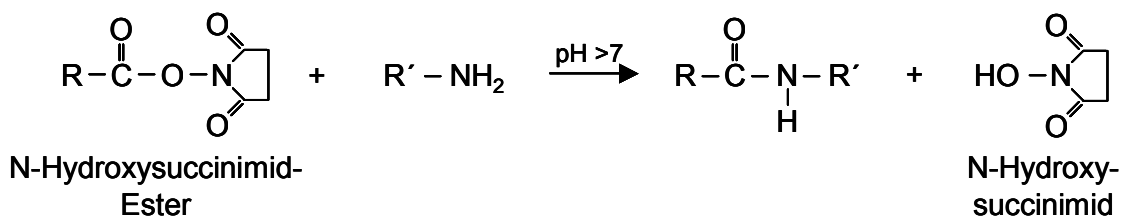
Bei der Entwicklung von Medikamenten werden immer häufiger sogenannte fotoaktivierbare Liganden eingesetzt, um die Zielmoleküle der Medikamente zu identifizieren und um deren Affinität, Selektivität bzw. Bindestelle zu bestimmen (Dorman und Prestwich, 2000). Auch bei Struktur- und Funktionsanalysen von Enzymen kommen solche fotoaktivierbaren Moleküle zum Einsatz (Hatanaka *et al.*, 2001; Yan und Lennarz, 2002a, b).

Mit Hilfe der Pmt1p Punkt- und Deletionsmutanten sollte hier der Versuch unternommen werden, die Pmt1p Bindedomäne des Akzeptorpeptides NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)-COOH zu bestimmen. Dieses Hexapeptid wird, genau wie das Pentapeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub>, im *in*

*vitro* Enzymtest von Pmt1p mannosyliert (Daten nicht gezeigt). Durch die Einführung einer fotoreaktiven Gruppe in das Akzeptorpeptid, kann eine lichtinduzierte, irreversible Bindung an Proteine die mit dem Peptid interagieren, erreicht werden. Die Quervernetzung wird nicht induziert, wenn Protein und Peptid sich nicht annähern bzw. miteinander wechselwirken. Die kovalent verknüpften Enzym/Peptid Komplexe können im Falle des  $\text{NH}_2\text{-YATAVK(Biotin)-COOH}$  durch spezifische anti-Biotin Antikörper, die das an Lysin (K) gekoppelte Biotin erkennen, im Immunoblot nachgewiesen werden. Wenn nun einzelne Pmt1p Punkt- bzw. Deletionskonstrukte nicht mehr in der Lage sind das Hexapeptid zu binden, dann sollte kein Enzym/Peptid Komplex nachzuweisen sein. So könnten mögliche Akzeptor-Bindedomänen innerhalb der Mannosyltransferase Pmt1p lokalisiert werden.

Um die Methode für das Wildtyp-Pmt1p zu etablieren, wurden drei unterschiedliche heterobifunktionelle Quervernetzer getestet. Alle drei besitzen am einen Ende ein N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester), das mit primären und sekundären Aminen reagiert, und eine kovalente Amidbindung ausbildet. Bei dieser Reaktion wird N-Hydroxysuccinimid frei (Abb. 3-30 A).

A



B



**Abb. 3-30: Reaktionsmechanismen der heterobifunktionellen Quervernetzer.** (A) Reaktionsschema der N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) mit primären Aminen. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen ( $\text{pH} > 7$ ) bilden NHS-Ester mit primären Aminen eine Amidbindung unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid. (B) Fotolysereaktion der Azidophenylgruppe. Die fotoreaktive Azidophenylgruppe ist chemisch inert. Bei Belichtung ( $\lambda$  300 – 460 nm) entsteht jedoch ein Arylnitren, das unspezifisch kovalente Bindungen eingeht.

Über diesen Reaktionsmechanismus wurden die drei Quervernetzer N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS) (Lewis *et al.*, 1977; Krieg *et al.*, 1986), N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat (SANPAH) (Baenziger und Fiete, 1982) und Sulfosuccinimidyl-2-(*p*-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD) (Chattopadhyay *et al.*, 1992; Lala *et al.*, 1996) einzeln an den freien N-Terminus des Hexapeptids gekoppelt. Bei der zweiten funktionellen Gruppe der Quervernetzer, handelt es sich um ein fotoaktivierbares Nitrophenylazid. Eine unspezifische Bindungsreaktion dieses fotoreaktiven Elements an benachbarte Gruppen wird durch Licht ( $\lambda$  300 – 460 nm) induziert (Abb. 3-30 B). Die funktionellen Gruppen der drei eingesetzten, heterobifunktionellen Quervernetzer sind somit identisch. Sie unterscheiden sich nur im Abstand zwischen den beiden reaktiven Gruppen voneinander (siehe Tabelle 3-2).

Quervernetzer	Abstand der funktionellen Gruppen	Eigenschaften
ANB-NOS	7,7 Å	nicht spaltbar
SANPAH	18,2 Å	nicht spaltbar
SASD	19,9 Å	Thiolspaltbar

**Tabelle 3-2: Eigenschaften der heterobifunktionellen Quervernetzer.**

Die entsprechenden heterobifunktionellen Quervernetzer wurden in einer ersten Reaktion an den Aminoterminus des Peptids NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)COOH gekoppelt. Die Kopplungsreaktion erfolgte im Dunkeln. Vor der Fotolysereaktion wurde Pmt1p<sup>HA</sup> aus Triton-Extrakten (2.2.3.4) mit einer monoklonalen anti-HA Affinitätsmatrix präzipitiert (2.2.3.5). Der so angereicherte Pmt1p<sup>HA</sup>-Pmt2p Enzymkomplex war aktiv, da im Präzipitat *in vitro* Mannosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach Zugabe der fotoreaktiven Hexapeptide zum Pmt1p<sup>HA</sup> Immunpräzipitat wurde die Fotolysereaktion für 10 min mit UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 312 nm gestartet (2.2.3.6). Die Reaktionsansätze wurden anschließend auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Western Blot mit anti-Biotin Antikörpern analysiert. Bei einer kovalenten Bindung des Hexapeptids an Pmt1p<sup>HA</sup> oder Pmt2p, wären Biotin-spezifische Banden mit apparenten Molekulargewichten von ~100 kDa bzw. ~74 kDa zu erwarten. Über die fotoreaktiven Gruppen von SANPAH und SASD konnten keine kovalenten Enzym/Peptid Komplexe gebildet werden, auch wenn im Falle von SASD nicht reduzierende Versuchs- und Elektrophorese-Bedingungen gewählt wurden. Im



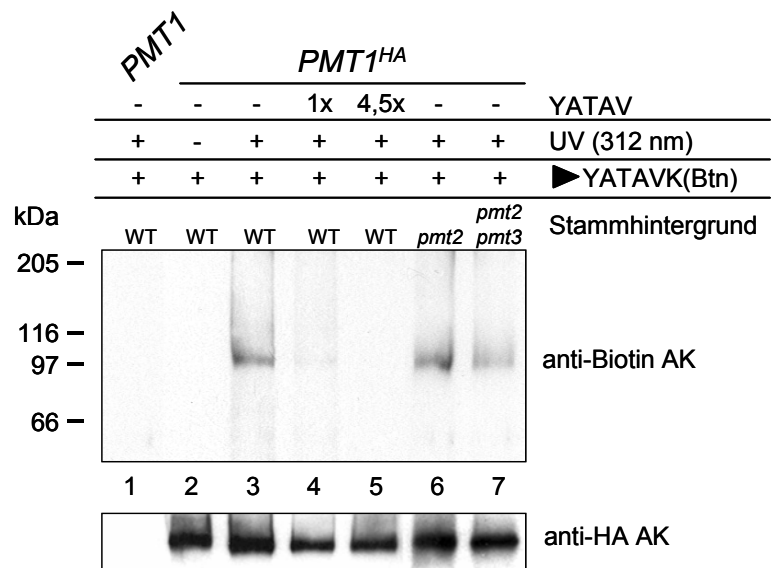
Immunoblot waren keine Biotin-spezifischen Signale detektierbar (nicht gezeigt). Erfolgreich war ausschließlich die Reaktion mit dem Quervernetzer ANB-NOS. Hier konnte mit dem anti-Biotin Antikörper eine Bande um 100 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-31, Spur 3). Eine nachträgliche Inkubation des Western Blots mit anti-HA spezifischen Antikörpern zeigte, dass die Biotin-spezifische Bande und das Pmt1p<sup>HA</sup> Signal deckungsgleich sind. Dies deutet auf eine kovalente Bindung des Hexapeptids an die Mannosyltransferase Pmt1p hin.

**Abb. 3-31:**

**Fotoaffinitätsmarkierung von Pmt1p<sup>HA</sup> mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin).**

Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56) wurde in einer *pmt1* (= WT), *pmt1pmt2* (= *pmt2*) und *pmt2pmt3* Mutante exprimiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich Pmt1p (pSB53) in einem *pmt1* Stamm (= WT) exprimiert. Die Immunpräzipitation erfolgte wie unter 2.2.3.5 beschrieben mit einer anti-HA Affinitätsmatrix.

Die Präzipitate wurden wie folgt behandelt: Pmt1p Präzipitat mit fotoreaktivem Peptid ANB-NOS-YATAVK(Biotin) (entspricht ►YATAVK(Btn)) und 10 min Belichtung mit UV (Spur 1), Pmt1p<sup>HA</sup> Präzipitat mit ►YATAVK(Btn) ohne Belichtung (Spur 2), Pmt1p<sup>HA</sup> mit ►YATAVK(Btn) und Belichtung (Spur 3), Pmt1p<sup>HA</sup> mit ►YATAVK(Btn) und YATAV im Verhältnis 1:1 (1x) und Belichtung (Spur 4), Pmt1p<sup>HA</sup> mit ►YATAVK(Btn) und YATAV im Verhältnis 1:4,5 (4,5x) und Belichtung (Spur 5), Pmt1p<sup>HA</sup> Präzipitat von einem *pmt2* Stammhintergrund mit ►YATAVK(Btn) und Belichtung (Spur 6) und Pmt1p<sup>HA</sup> Präzipitat von einem *pmt2pmt3* Stammhintergrund mit ►YATAVK(Btn) und Belichtung (Spur 7). Die Präzipitate wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit anti-Biotin und anti-HA Antikörpern (AK) analysiert.

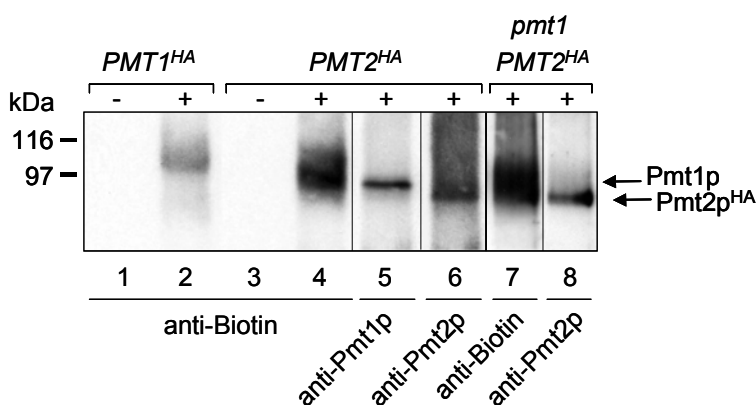


Folgende Kontrollen zeigten dass die Reaktion spezifisch war. i) Es konnte keine Biotin-spezifische Bande detektiert werden, wenn das Wildtyp Pmt1p ohne HA-Epitop in die Immunpräzipitation eingesetzt wurde (Abb. 3-31, Spur 1). Eine Bindung an unspezifisch gefällte Proteine kann somit ausgeschlossen werden. ii) Die Bindung des Peptids an ein Protein erfolgte ausschließlich nach Belichtung mit UV-Licht (Abb. 3-31, Spur 2). iii) Das Pentapeptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> ist in der Lage das Hexapeptid aus dem Enzym/Substrat Komplex vollständig zu verdrängen; die beiden Peptide konkurrieren also um die selbe

Bindestelle (Abb. 3-31, Spuren 4 und 5). iv) ANB-NOS-YATAVK(Biotin) bindet kovalent an  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$ , auch wenn die Interaktionspartner  $\text{Pmt2p}$  und/oder  $\text{Pmt3p}$  fehlen (Abb. 3-31, Spuren 6 und 7). Die Bindungseffekte sind eindeutig auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen, da  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  in allen Fällen etwa zu gleichen Mengen präzipitiert wurde (Abb. 3-31, anti-HA AK, vgl. Spuren 2 – 7).

Unter den oben gezeigten Bedingungen konnten keine Wechselwirkungen des Hexapeptids mit den Mannosyltransferasen  $\text{Pmt2p}$  oder  $\text{Pmt3p}$  nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die fotoaktivierbare Gruppe aus sterischen Gründen ausschließlich mit  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  in Verbindung tritt. Eine andere Erklärung wäre, dass die Menge an co-präzipitiertem Material zu gering ist und potentielle Protein/Peptid Verbindungen unter der Nachweisgrenze liegen.

Um letztere Möglichkeit zu überprüfen, wurde  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$  und  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  in parallelen Ansätzen mit einer anti-HA Affinitätsmatrix präzipitiert und mit dem fotoaktivierbaren Peptid inkubiert. Abbildung 3-32 zeigt den mit anti-Biotin Antikörpern dekorierten Immunoblot in den Spuren 1 bis 4. Nach der Behandlung mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin) konnte im  $\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  Immunpräzipitat wie erwartet eine ~100 kDa Bande detektiert werden (Abb. 3-32, Spur 2). Dagegen wurde im  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$  Präzipitat ein diffuses, Biotin-spezifisches Signal von ~92 bis 100 kDa nachgewiesen (Abb. 3-32, Spur 4).



**Abb. 3-32:**  
**Fotoaffinitätsmarkierung**  
**mit  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$**   
**Immunpräzipitaten.**

$\text{Pmt1p}^{\text{HA}}$  (pSB56) wurde in einem *pmt1* (Spuren 1 und 2) und  $\text{Pmt2p}^{\text{HA}}$  (pVG80) in einem *pmt2* (Spuren 3 und 4) bzw. *pmt1pmt2* (entspricht *pmt1*, Spuren 7 und 8) Stammhintergrund exprimiert. Die Immunpräzipitation der HA-markierten Enzyme erfolgte mit einer monoklonalen anti-HA Affinitäts-

matrix (2.2.3.5). Die Präzipitate wurden mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin) (+) bzw. nur mit ANB-NOS ohne Peptid (-) inkubiert und auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Western Blot wurde nacheinander mit anti-Biotin (Spuren 1 – 4, 7), anti-Pmt1p (Spur 5) und anti-Pmt2p (Spuren 6 und 8) Antikörpern analysiert.

Um zu testen, ob hier das Peptid an Pmt1p und/oder an Pmt2p<sup>HA</sup> gebunden vorliegt, wurde der Immunoblot des Pmt2p<sup>HA</sup> Präzipitats (Abb. 3-32, Spur 4) nacheinander mit polyklonalen anti-Pmt1p (Abb. 3-32, Spur 5) und anti-Pmt2p Antikörpern (Abb. 3-32, Spur 6) inkubiert. Die Mannosyltransferase Pmt1p trennte mit einem apparenten Molekulargewicht von 92 kDa auf und lag somit im unteren Bereich des Biotin-spezifischen Signals (Abb. 3-32, vgl. Spuren 4 und 5). Pmt2p<sup>HA</sup> besitzt ein apparentes Molekulargewicht von ~88 kDa und läuft damit im SDS-Polyacrylamidgel geringfügig schneller als sein Pmt1p Interaktionspartner.

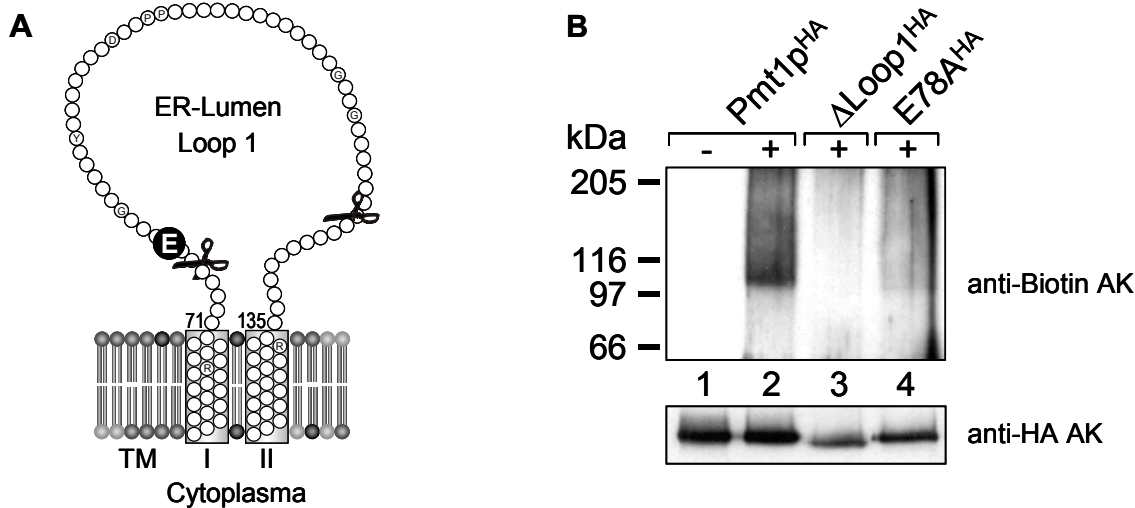
Fehlt der Interaktionspartner, wie in der *pmt1* Mutante (Abb. 3-32, Spuren 7 und 8), dann zeigt das Biotin-spezifische Signal ein apparentes Laufverhalten, welches mit dem von Pmt2p<sup>HA</sup> vergleichbar ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass in der Wildtyp-Situation das Hexapeptid vorwiegend an Pmt1p gebunden wird. YATAVK(Biotin) interagiert also nicht mit Pmt2p, wenn Pmt1p anwesend ist. Nur durch den Verlust des Interaktionspartners wird ein Teil des Peptids an Pmt2p gebunden.

Die Inkubation eines Pmt4p<sup>FLAG</sup> Präzipitats mit dem fotoreaktiven Hexapeptid hatte keine Bindung an Pmt4p zur Folge. Dies wäre auch zu erwarten, da Pmt4p das Peptid Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> *in vitro* nicht mannosylieren kann (Daten nicht gezeigt). Dies macht deutlich, dass die Fotoaffinitätsmarkierung mit YATAVK(Biotin) für die Mannosyltransferase spezifisch ist, die das Peptid als Mannose-Akzeptor nutzen kann.

Unter den gewählten Bedingungen wird also der größte Teil des Peptids YATAVK(Biotin) an Pmt1p gebunden. Mit Hilfe der Pmt1p Deletions- und Punktmutanten sollten für eine Bindung wichtige Domänen identifiziert werden.

Zunächst wurden die im luminalen Loop 1 mutierten Pmt1p Konstrukte  $\Delta$ Loop1<sup>HA</sup> und E78A<sup>HA</sup> untersucht. Die Deletionsmutante  $\Delta$ Loop1<sup>HA</sup> (siehe Abb. 3-33 A) ist nicht mehr in der Lage mit Pmt2p zu interagieren. Dennoch sollte eine Aussage über das Bindungsverhalten des Akzeptorpeptids möglich sein, da die Kopplung des fotoaktivierbaren Hexapeptids an Pmt1p unabhängig vom Interaktionspartner erfolgt (Abb. 3-31, Spur 6). Die Punktmutante E78A (siehe Abb. 3-33 A) wurde in den Test mit eingeschlossen, da die *in vitro* Mannosyltransferase-Aktivität des mutierten Proteins durch den Austausch auf 13,2 % im Vergleich zum Wildtyp zurückfällt (siehe Ergebnisse 3.3.1).

Ob dieser dramatische Aktivitätsverlust auf eine reduzierte Akzeptorbindung zurückzuführen ist, sollte mit Hilfe der Fotoaffinitätsmarkierung geklärt werden.



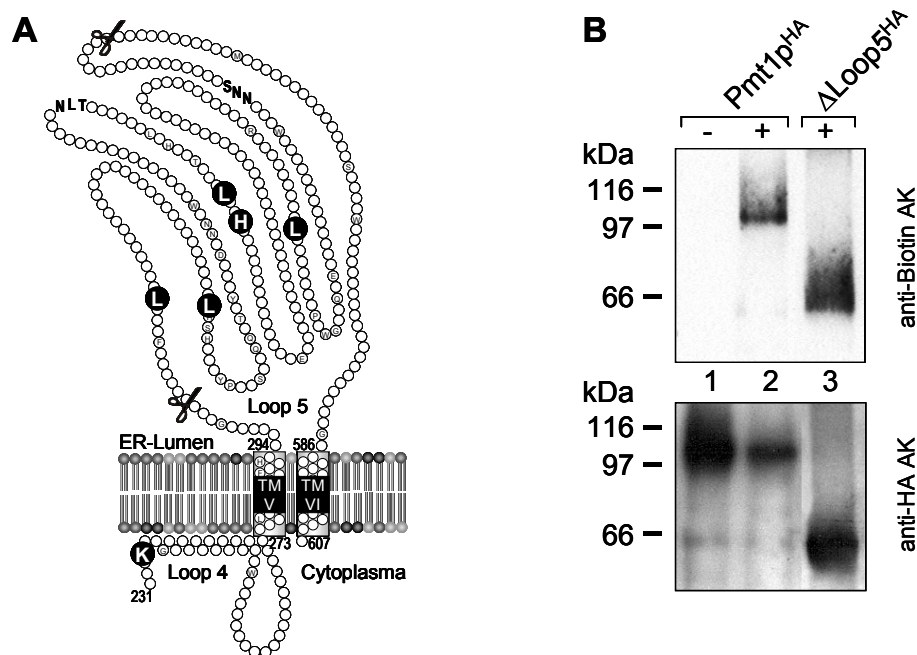
**Abb. 3-33: Fotoaffinitätsmarkierung der mutierten Enzyme Pmt1p  $\Delta$ Loop1<sup>HA</sup> und E78A<sup>HA</sup>.** (A) Schematische Darstellung der Pmt1p Loop1 Domäne. Der deletierte Bereich ist mit Scheren markiert; die mutierte Aminosäure E78 ist hervorgehoben. (B) Fotoaffinitätsmarkierung. Die Expression des Wildtyp Pmt1p<sup>HA</sup> und der Pmt1p Konstrukte  $\Delta$ Loop1<sup>HA</sup> (pSB101) und E78A<sup>HA</sup> (pSB112) erfolgte in einer *pmt1* Mutante. Mit einer anti-HA Affinitätsmatrix wurden die HA-markierten Proteine immunpräzipitiert und mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin) (+) bzw. mit dem Quervernetzer ANB-NOS ohne Peptid (-), wie unter 2.2.3.6 beschrieben, inkubiert. Die Präzipitate wurden anschließend auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot nacheinander mit anti-Biotin und anti-HA Antikörpern (AK) analysiert.

Abbildung 3-33 B zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse. Das wildtypische Pmt1p<sup>HA</sup> wurde über den fotoaktivierbaren Quervernetzer ANB-NOS, kovalent an das Peptid YATAVK(Biotin) gekoppelt (Abb. 3-33 B, Spur 2). Im Vergleich dazu konnte bei dem Deletionskonstrukt  $\Delta$ Loop1<sup>HA</sup> keine Verknüpfung nachgewiesen werden (Abb. 3-33 B, Spur 3). Erst nach sehr langer Exposition des Röntgenfilms war ein schwaches Signal mit einem apparenten Molekulargewicht von ~97 kDa detektierbar (nicht gezeigt). Dieses, im Vergleich zum Wildtyp-Pmt1p<sup>HA</sup> (~100 kDa) schnellere Laufverhalten, ist auf das reduzierte Molekulargewicht des Deletionskonstruktes zurückzuführen.

Der Aminosäureaustausch E78A führte ebenfalls dazu, dass nur noch geringe Mengen von YATAVK(Biotin) an das Enzym gekoppelt wurden (Abb. 3-33 B, vgl. Spuren 2 und 4). Dies deutet darauf hin, dass die Loop1 Domäne der Mannosyltransferase für die Bindung des Akzeptorpeptids wichtig ist. Der *in vitro* Aktivitätsverlust der E78A Punktmutante

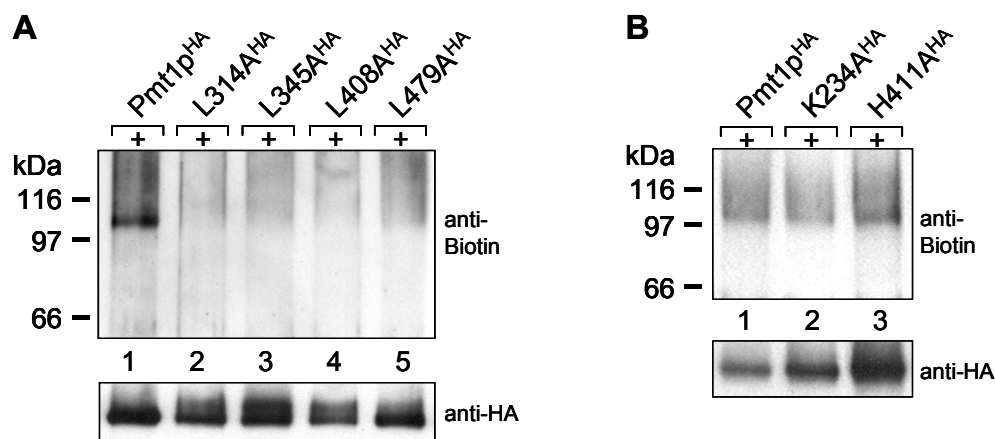
könnte somit durch eine eingeschränkte Wechselwirkung von Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> mit dem mutierten Enzym erklärt werden.

Als nächstes wurde die im luminalen Loop 5 betroffene Deletionsmutante Pmt1p  $\Delta$ Loop5<sup>HA</sup> (Abb. 3-34 A) untersucht. Wie aus Abbildung 3-34 B ersichtlich, konnte im Präzipitat der  $\Delta$ Loop5<sup>HA</sup> Mutante (Spur 3) ein diffuses, Biotin-spezifisches Signal mit einem apparenten Molekulargewicht von ~65 bis ~79 kDa detektiert werden. Durch das nachträgliche Inkubieren des Immunoblots mit anti-HA spezifischen Antikörpern wurde eine ~65 kDa Bande als  $\Delta$ Loop5<sup>HA</sup> Protein identifiziert (Abb. 3-34 B, siehe Spur 3 unten). Daraus folgt, dass das biotinylierte Peptid nach wie vor an das Deletionskonstrukt binden kann. Loop 5 wird somit nicht für die Bindung des Akzeptorpeptids benötigt. Weshalb sich das Biotin-Signal über einen Bereich von ~14 kDa erstreckt, kann derzeit nicht eindeutig beantwortet werden. Möglich wäre, dass nicht vollständig abreagierter Quervernetzer aus der Peptid-Kopplungsreaktion bei der Fotoaktivierung störte.



**Abb. 3-34: Fotoaffinitätsmarkierung der in Loop 5 betroffenen Pmt1p Mutanten.** (A) Schematische Darstellung der Pmt1p Loop5 Domäne. Der deletierte Bereich ist mit Scheren markiert; die mutierten Aminosäuren K234A, L314A, L345A, L408A, H411A und L479A sind hervorgehoben. (B) Fotoaffinitätsmarkierung. Die Expression von Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56) und  $\Delta$ Loop5<sup>HA</sup> (pVG13) erfolgte in einer *pmt1* Mutante. Mit einer anti-HA Affinitätsmatrix wurden die HA-markierten Proteine immunpräzipitiert und mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin) (+) bzw. mit dem Quervernetzer ANB-NOS ohne Peptid (-), wie unter 2.2.3.6 beschrieben, inkubiert. Die Präzipitate wurden anschließend auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot nacheinander mit anti-Biotin und anti-HA Antikörpern (AK) analysiert.

Punktmutationen innerhalb dieses hydrophilen Loops, sollten die Bindung des Peptids nach oben gezeigten Daten nicht beeinflussen. Um dies zu prüfen, wurden die vier Leucin-Punktmutanten (siehe Abb. 3-34 A), mit dem fotoaktivierbaren Peptid inkubiert. Wie bereits gezeigt, besitzen die Enzyme L314A<sup>HA</sup>, L345A<sup>HA</sup> und L408A<sup>HA</sup> im *in vitro* Enzymtest eine Restaktivität von < 20 %; L479A<sup>HA</sup> ist noch zu 44 % aktiv (3.3.1). Abbildung 3-35 A zeigt, dass ausschließlich im Präzipitat von Pmt1p<sup>HA</sup> ein distinkte, Biotin-spezifische Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ~100 kDa nachgewiesen werden konnte (Spur 1). Obwohl die HA-markierten Punktmutanten effizient immunpräzipitiert wurden (Abb. 3-35 A, vgl. Spuren 1 mit 2 – 5 unten), erfolgte offensichtlich keine Bindung des biotinylierten Peptids an die mutierten Proteine.



**Abb. 3-35: Fotoaffinitätsmarkierung der Pmt1p Punktmutanten.** Die Expression von Pmt1p<sup>HA</sup> (pSB56), K234A<sup>HA</sup> (pTZ6), L314A<sup>HA</sup> (pVG32), L345A<sup>HA</sup> (pVG31), L408A<sup>HA</sup> (pSB108), H411A<sup>HA</sup> (pVG64) und L479A<sup>HA</sup> (pVG30) erfolgte in einem *pmt1* Stammhintergrund. Die Fotoaffinitätsmarkierung wurde wie unter 2.2.3.6 beschrieben mit ANB-NOS-YATAVK(Biotin) (+) durchgeführt. Die Präzipitate wurden anschließend auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot nacheinander mit anti-Biotin und anti-HA Antikörpern (AK) analysiert. (A) Fotoaffinitätsmarkierung der Leu-Mutanten L314A<sup>HA</sup>, L345A<sup>HA</sup>, L408A<sup>HA</sup> und L479A<sup>HA</sup>. (B) Fotoaffinitätsmarkierung der K234A<sup>HA</sup> und H411A<sup>HA</sup> Mutanten.

Dieses Ergebnis steht einerseits im Widerspruch zu der Beobachtung, dass die luminal Domäne 5 nicht für die Bindung des Mannose-Akzeptors benötigt wird. Andererseits würde es erklären, weshalb die Leu-Mutanten nur noch eine geringe Enzymaktivität aufweisen. Es stellt sich die Frage, ob der Aktivitätsverlust tatsächlich auf die veränderten Bindungseigenschaften der mutierten Proteine zurückzuführen ist. Um dies zu klären wurden zwei weitere Punktmutanten – K234A<sup>HA</sup> und H411A<sup>HA</sup> – deren Mannosyltransferase-Aktivität kaum beeinträchtigt ist (jeweils ~80 % Restaktivität), mit

dem fotoaktivierbaren Peptid inkubiert. Die Aminosäure Lys234 ist im Loop 4 und somit auf der cytoplasmatischen Seite des ERs lokalisiert (siehe Abb. 3-34 A). Da die Mannosylierungsreaktion im ER-Lumen stattfindet und hier auch der Akzeptor gebunden wird (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), sollte durch die Mutation K234A keine verminderte Peptidbindung zu beobachten sein. Dagegen befindet sich His411 in unmittelbarer Nachbarschaft zu Leu408 im luminalen Loop 5. Die Mutante L408A besitzt eine *in vitro* Aktivität von ~15 %, während H411A noch zu 82 % aktiv ist. Da in letzterem Fall eine hohe Transferrate erreicht wird, sollte die Peptidbindung kaum betroffen sein.

Abbildung 3-35 B zeigt das Ergebnis der Fotoreaktion des Peptids mit den Punktmutanten K234A<sup>HA</sup> und H411A<sup>HA</sup>. Sowohl K234A<sup>HA</sup>, als auch H411A<sup>HA</sup> sind in der Lage YATAVK(Biotin) zu binden (vgl. Spuren 1 – 3, anti-Biotin). Dies zeigt, dass der Aktivitätsverlust der in Loop 5 lokalisierten Leu-Mutanten auf eine verminderte Bindungsfähigkeit des Peptidsubstrats zurückzuführen ist. Die funktionellen Gruppen der Leucine könnten eine wichtige Rolle bei der Koordination des Substrates spielen, oder strukturelle Funktionen übernehmen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der luminal orientierte Loop 1, unter den hier getesteten Bedingungen, an der Ausbildung eines Enzym/Peptid Komplexes beteiligt ist. Durch den Aminosäureaustausch E78A in dieser Domäne, ist die Wechselwirkung mit YATAVK(Biotin) stark beeinträchtigt. Die im Loop 5 lokalisierten Leucinreste (Leu314, Leu345, Leu408 und Leu479) spielen für die Bildung eines Enzym/Peptid Komplexes ebenfalls eine wichtige Rolle, wobei die Deletion der gesamten Loop 5 Domäne keinen Einfluss auf die Bindung des Peptidsubstrats hat. Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf eine Maskierung der Bindestelle durch strukturelle Veränderungen zurückzuführen sein (siehe dazu Diskussion 4.3).

### 3.4 DNA-SEQUENZKORREKTUR VON *PMT2*

Die Mannosyltransferase Pmt2p wurde für die Co-Immunpräzipitationsexperimente mit einem sechsfachen Hämagglutinin-Epitop fusioniert. Das resultierende *PMT2<sup>HA</sup>* Konstrukt wurde mit Hilfe einer DNA-Sequenzanalyse auf Fehler überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass es zwischen der DNA-Sequenz aus der Sequenzanalyse und dem Hefe-Datenbankeintrag Unterschiede gibt (Genbank Acc.No. AAC04934). Um auszuschließen, dass es sich hier um eine Stamm-spezifische Abweichung des SEY6210 Wildtyps handelt, wurde die genomische DNA-Sequenz der Hefestämme S288c, BY4742, W303-1A und SEY6210 bestimmt. Die Analyse ergab, dass im Gegensatz zum Datenbankeintrag, das offene Leseraster von *PMT2*, drei zusätzliche Basenpaare enthält (Abb. 3-36). Die Aminosäuresequenz ändert sich durch die Insertionen an Position 137 von Leu-Leu (Datenbank) zu Pro-Ser-Gly (Abb. 3-36 und 3-37).

#### A) Hefe-Datenbankeintrag (Acc.No. AAC04934)

+400bp – TGG GAC TTC CTT CTG GAA ATT TAC CCA – +426bp  
 AS 134 – Trp Asp Phe Leu Leu Glu Ile Tyr Pro – AS 142

#### B) Sequenzanalyse *PMT2*

+400bp – TGG GAC TTC **CC**T TCT **GGG** **G**AA ATT TAC CCA – +426bp  
 AS 134 – Trp Asp Phe **Pro** **Ser** **Gly** Glu Ile Tyr Pro – AS 143

**Abb. 3-36: Ergebnis der DNA Sequenzanalyse des offenen Leserahmens von *PMT2*.** Die amplifizierten PCR-Fragmente genomischer DNA aus den Hefestämmen S288c, BY4742, W303-1A und SEY6210 wurden in den Vektor pGEM T-easy ligiert (siehe 2.2.2.12) und mehrere unabhängige Klone sequenziert. (A) *PMT2* DNA-Sequenz in der Hefe-Datenbank. (B) *Ergebnis der DNA-Sequenzanalyse*. Alle analysierten PCR-Fragmente enthielten eine Insertion von drei Basenpaaren (grau hinterlegt). Daraus folgt eine veränderte AS-Sequenz (grau hinterlegt).

Vergleicht man die Aminosäureabfolge der zu 65 % identischen Mannosyltransferasen Pmt2p und Pmt3p miteinander, dann ergibt sich für den Bereich "Pmt2p AS 137 Pro-Ser-Gly" eine volle Übereinstimmung mit der Pmt3p Sequenz (Abb. 3-37). Die korrigierte



*PMT2* Sequenz ist in der Datenbank "Stanford Genomic Resources" (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) zugänglich.

ScPmt2p	1	MSSSSSTGYSKNNAHIKQENTLRQRESSSISVSEELSSADERDAEDFSKEKPAAQSSLL
ScPmt3p	1	MPYRVATGYSEK-----STDDDLIWRTPIVKEELEDADNFLKDDAELYDKVK--NESAVS
ScPmt2p	61	RLESVMPVIFTALALFTRMYKIGINNHVVWDEAHFGKFGSYYLRHEFYHVDVHPPLGKML
ScPmt3p	54	HLDTIVMFIIFTVLGMFTRMKYKIGRNNHVVWDEAHFGKFGSYYLRHEFYHVDVHPPLGKML
ScPmt2p	121	VGLSGYLAGYNGSWDFPSGEIYDPDYLDYVKMRLFNASFALCVPLAYFTAKAIGFSLPTV
ScPmt3p	114	VGLSGYLAGYNGSWDFPSGEVYPDYIDYVKMRLFQAMFSSLCVPLAYFTGRAIGFSRLSV
ScPmt2p	181	WLMTVLVLFENSYSTLGRFILLDSMLLFFTVASFFSFVMFHNQRSKPFSSRKWWKLLITG
ScPmt3p	174	WLFTILVIFENSYATLGKFILLDSMLLFFTSSYFCLAKFHTMRKSPFSARWWLWLCLTG
ScPmt2p	241	ISLGCTISVKMVGLFIITMVGIIYTVIDLWTFADKSMWKTYINHWLARIFGLIIVPFCI
ScPmt3p	234	LNLGCAISVKMVGLFIISVVGIIYTISELWNLLSDRSVSWKVYVNHWLARIFGLIIVPVCV
ScPmt2p	301	FLLCFKIHFDLLSHSGTGDANMPSLFQARLVGSDVGQGRDIALGSSVSVSIKNQALGSSL
ScPmt3p	294	FLLCFKIHFDLLSNSGPGDSTMPSLFQASLNGTKVGKGRDVALGSSIIISIKNQALGGAL
ScPmt2p	361	LHSHIQTYPDGSNQQQVTCYGYKDANNEWFFNRERGLPSWSENE-TDIEYLPKPGTSYRLV
ScPmt3p	354	LHSHVQPFPEGSEQQQVTVYGYSDANNEWFFQIRIGVEPWDAENKTIEFVKGGEYRLM
ScPmt2p	420	HKSTGRNLHTHPVAAPVSKTQWEVSGYGDNVVGDNDKNWVIEIMDQRGDEDPEKLHTLT
ScPmt3p	414	HRLTGKNLHTHEVPAPISKSEYEVSAVDVLDGDKDNWIEIVEQVGEEDPTLLHPLST
ScPmt2p	480	SFRIKNLEMGCYLAQTGNSLPEWGFQGEVVMKNPFKRDKRTWWNIETHENERLPPRPE
ScPmt3p	474	SFRIKNSILGCYLAQSGKHLPEWGFQGEVVCCLKHASKRDKRTWWNIETHENERLP-QGE
ScPmt2p	540	DFQYPKTNEFLKDFIHLNLAMMATNNALVPDDEKFDYLASSAWQWPTLNVGLRLCGWDDN
ScPmt3p	533	DFVYPKTSEFRNFMQLNSAMMATNNALVNPPEKFDGIASSAWQWPTLNVGVRLCEWSEKS
ScPmt2p	600	PKYFLLGTPASTWASSVAVLAFMATVVILLIRWQRQYVDLRNPSNWNVFLMGGFYPLLAW
ScPmt3p	593	IKYFLLGSPASVWPSSIIVCALIIHVIFLTLKWQRQCVILSDPVERDVFVMAAFYPLLAW
ScPmt2p	660	GLHYMPFVIMSRVTYVHHYLPALYFALIIILAYCFDAGLQKWSRSKCGRIMRFVLYAGFMA
ScPmt3p	653	LLHYMPFVIMSRVVYAHHYLPTLYFALMILSYFDMITKRWATRNTGKFLRLGAYIVYGS
ScPmt2p	720	LVIGCFWYFSPISFGMEGPFSSNFRYLNWFSTWDIADKQEA-
ScPmt3p	713	IVIAGFFYFSPFSFGMDGPFVDDYAYLAWLPTWQIVEDIRNT

**Abb. 3-37: Gruppierung der Aminosäuresequenzen von ScPmt2p und ScPmt3p.** Die Gruppierung erfolgte mit dem Programm ClustalW (siehe 2.1.7) (Thompson *et al.*, 1994). Die korrigierte Aminosäuresequenz "PSG" ist schwarz, die in beiden Proteinen identischen Aminosäuren sind grau hinterlegt.

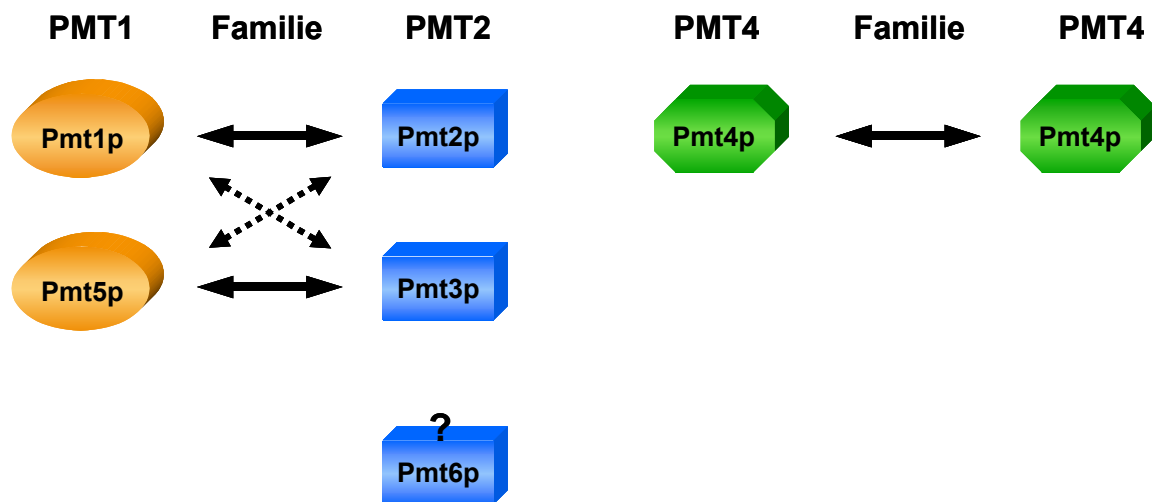
## 4 DISKUSSION

Die Modifikation sekretorischer Proteine mit O-glykosidisch gebundenen Mannosen ist für die Lebensfähigkeit von Hefezellen essentiell (Gentzsch und Tanner, 1996; Willer, 2002). Eine universelle Funktion der Protein-Glykosylierung ist bislang nicht erkennbar. Die Charakterisierung glykosylierungsdefizienter Hefestämme zeigt jedoch, dass die O-Mannosylierung für Zellintegrität und normale Morphogenese unentbehrlich ist (Timpel *et al.*, 1998; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999; Timpel *et al.*, 2000). Zudem mehren sich die Hinweise, dass sowohl die Stabilität, Funktion, als auch die Lokalisation einzelner Proteine durch diese Proteinmodifikation beeinflusst werden kann (Bourdineaud *et al.*, 1998; Buurman *et al.*, 1998; Ketela *et al.*, 1999; Lodder *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 1999; Philip und Levin, 2001, Lommel und Strahl unveröffentlicht). Des weiteren wurde beobachtet, dass durch O-Mannosylierung der retrograde Transport falsch gefalteter Proteine aus dem ER-Lumen beeinträchtigt wird (Harty *et al.*, 2001).

Neueste Daten belegen, dass die O-Mannosylierung von Proteinen nicht nur in Hefe, sondern auch bei Menschen eine wichtige Rolle spielt. Glykosylierungsdefekte führen in diesem Fall zu ernsthaften Erkrankungen, wie Muskeldystrophie und neuronalen Migrationsstörungen (Yoshida *et al.*, 2001; Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Mäuse, deren *PMT*-homologen Gene deletiert wurden, nicht lebensfähig sind (siehe Einleitung 1.1.2) (Willer, persönliche Mitteilung). *PMT*-Homologe wurden in allen bisher untersuchten tierischen Organismen – mit Ausnahme von *C. elegans* – gefunden. Pflanzen besitzen dagegen keine *Pmt*s. Trotz der großen offensichtlichen Bedeutung dieser Modifikationsart für eine Vielzahl von Organismen, ist über die Funktionsweise der Protein O-Mannosyltransferasen, welche die Glykosylierungsreaktion initiieren, so gut wie nichts bekannt. Diese Arbeit vermittelt am Beispiel des Modellorganismus *S. cerevisiae* erstmals einen Einblick in die Organisation und Arbeitsweise der *Pmt*s.

#### 4.1 PMT-KOMPLEXE IN *S. CEREVISIAE*

Die PMT-Familie der Bäckerhefe besteht aus den sieben Mitgliedern *PMT1-7* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). In unserem Labor wurden bisher die Enzyme Pmt1p bis Pmt6p eingehend charakterisiert (Gentzsch und Tanner, 1996, 1997; Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999; Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach und Strahl, 2003). Phylogenetisch werden alle Mitglieder der PMT-Familie in PMT1-, PMT2- und PMT4-Subfamilien (vgl. Abb. 1-2) untergliedert, wobei die einzelnen Untergruppen Transferasen mit starker Homologie zu ScPmt1p, ScPmt2p bzw. ScPmt4p enthalten (Willer *et al.*, 2002). Pmt1p und Pmt2p aus *S. cerevisiae* bilden *in vivo* einen Enzymkomplex, um den Transfer von Mannosylresten auf Serin- und Threoninseitenketten sekretorischer Proteine effizient zu katalysieren (Gentzsch *et al.*, 1995; Girrbach *et al.*, 2000). Diese Arbeit zeigt, dass die Bildung spezifischer Enzymkomplexe ein allgemeines Merkmal der Pmtps aus Bäckerhefe darstellt (Girrbach und Strahl, 2003).



**Abb. 4-1: Interaktionsmodell für die PMT-Familienmitglieder Pmt1-6p aus *S. cerevisiae*.** Durchgehende Pfeile deuten (dominante) Interaktionen zwischen den entsprechenden Pmtps an; gestrichelte Pfeile markieren "alternative" Protein/Protein Wechselwirkungen, die unter bestimmten physiologischen Bedingungen gebildet werden. Für Pmt6p konnte bisher kein Interaktionspartner identifiziert werden (?). Das hier gezeigte Modell basiert auf den Ergebnissen dieser Arbeit.

Wie in Abbildung 4-1 dargestellt, interagieren die Mitglieder der PMT1-Subfamilie (Pmt1p und Pmt5p) spezifisch mit den Mitgliedern der PMT2-Subfamilie (Pmt2p und Pmt3p). Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Enzymkomplexe stellen die dominanten Formen

im Wildtyp dar, wohingegen die weniger häufig vertretenen Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe nur unter bestimmten Bedingungen gebildet werden (z.B. in *pmt* Deletionsmutanten).

Pmt6p, das dritte Mitglied der PMT2-Subfamilie, interagiert weder mit den Mannosyltransferasen Pmt1p bis Pmt5p, noch mit sich selbst. Dennoch konnten hochmolekulare, Pmt6p-spezifische Formen identifiziert werden. Das Enzym ist somit Teil eines Komplexes, dessen Komponenten noch identifiziert werden müssen.

Pmt4p, der einzige Vertreter der PMT4-Subfamilie, bildet im Gegensatz zu allen anderen Mannosyltransferasen der PMT-Familie, homotypische Enzymkomplexe. Ebenfalls einzigartig innerhalb der PMT-Familie ist die Tatsache, dass *in vivo* zwei hochmolekulare, Pmt4p-spezifische Formen existieren. Dies deutet darauf hin, dass Pmt4p neben dem Homodimer auch Homotrimere oder Heterooligomere ausbilden kann.

#### **4.1.1 Komplexbildung zwischen PMT1- und PMT2-Familienmitgliedern**

##### **4.1.1.1 Die paralogen Proteinpaare Pmt1p/Pmt5p und Pmt2p/Pmt3p**

Die PMT1- und PMT2-Subfamilien von *S. cerevisiae* sind im Vergleich zur PMT4-Subfamilie redundant. Die Aminosäuresequenz der PMT1-Familienmitglieder, Pmt1p und Pmt5p, ist zu ~53 % identisch und zu ~72 % homolog. Die Vertreter der PMT2-Subfamilie (Pmt2p und Pmt3p) weisen sogar eine Identität von ~65 % und eine Homologie von ~81 % auf (Gentzsch, 1996). Der hohe Konservierungsgrad zwischen den Vertretern dieser Untergruppen, könnte auf paraloge, also durch Genduplikation entstandene Proteine hindeuten. Tatsächlich finden solche Duplikationen eines oder mehrerer Gene in Eukaryoten mit einer sehr hohen Rate von ~1 % pro Gen pro 1 Million Jahre statt (Lynch und Conery, 2000). Die Konsequenz daraus ist, dass fast 1/3 eines typischen Eukaryotengenoms aus duplizierten Genen bzw. Genfamilien besteht (Wagner, 2001). Die Vermutung, dass es sich bei Pmt1p und Pmt5p um paraloge Enzyme handelt, wird von der Tatsache gestützt, dass beide offene Leserahmen (YDL095w bzw. YDL093w) direkt nebeneinander auf Chromosom IV liegen. Zudem gibt es Hinweise, dass u.a. das Proteinpaar Pmt2p (YAL023c, Chromosom I) und Pmt3p (YOR321w, Chromosom XV) durch eine Duplikation des gesamten Hefegenoms entstand (Wolfe und Shields, 1997; Seoighe und Wolfe, 1999). Im Verlauf der Evolution haben sich die Protein/Protein

Wechselwirkungen zwischen den PMT1- und PMT2-Familienmitgliedern etabliert. Die paraloge Entwicklung der Enzyme würde erklären, weshalb neben den dominanten Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexen zusätzlich Interaktionen zwischen Pmt1p und Pmt3p, sowie Pmt5p und Pmt2p beobachtet werden.

#### **4.1.1.2 Relevanz der Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe in vivo**

Welche Rolle die Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p Komplexe *in vivo* spielen ist nicht eindeutig geklärt. Dass sie unter bestimmten physiologischen Bedingungen eine wichtige Funktion übernehmen, wird jedoch durch mehrere Beobachtungen gestützt. Zum einen sind in der *pmt1pmt3* Mutante, in der die dominanten Proteinkomplexe nicht mehr ausgebildet werden können, die Proteinmengen an Pmt2p und Pmt5p um den Faktor zwei im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Zusätzlich zeigt dieser Stamm eine Steigerung der Mannosyltransferase-Aktivität von 68 % gegenüber einer *pmt1pmt2* Mutante. Darüber hinaus konnten in der *pmt1pmt3* Doppelmutante hochmolekulare, Pmt5p-Pmt2p-Enzymkomplexe nachgewiesen werden. Ähnliches wurde bei der Analyse des *pmt2pmt5* Stammes beobachtet. In diesem Fall ist die Menge an Pmt3p im Vergleich zum Wildtyp erhöht und die Enzymaktivität gegenüber einer *pmt1pmt2* Mutante um 43 % gesteigert (siehe Ergebnisse 3.1.2.3 bis 3.1.2.5). Zusammengenommen deuten diese Daten auf einen Kompensationsmechanismus hin, bei dem das Fehlen der jeweils bevorzugten Interaktionspartner durch Akkumulation von Pmt5p-Pmt2p bzw. Pmt1p-Pmt3p Komplexen kompensiert wird. Dieser Kompensationseffekt ist in verschiedenen *pmt*-Mutanten zu beobachten. So z.B. im *pmt1pmt4* Stamm, dessen temperatursensitiver Phänotyp durch die Überexpression von *PMT2* komplementiert werden kann. Durch den "Überschuss" an Pmt2p in der Hefezelle werden Pmt5p-Pmt2p Komplexe gebildet, die zumindest teilweise den Verlust des Pmt1p-Pmt2p Komplexes funktionell ersetzen. Solch eine funktionelle Kompensation wird bei paralogen Proteinen häufig beobachtet (Gu *et al.*, 2003). Dieses Prinzip erklärt auch, weshalb in *S. cerevisiae* nur die gleichzeitige Deletion mehrerer *PMT*-Gene zu ausgeprägten Phänotypen, wie Osmolabilität, Temperatursensitivität (*pmt2pmt3* und *pmt2pmt4* Mutanten), bis hin zur Letalität führen (*pmt1pmt2pmt4* Mutante) (Gentzsch und Tanner, 1996). Die Kompensation wird im Fall der Bäckerhefe also durch die Redundanz der PMT1- und PMT2-Familienmitglieder ermöglicht. Im Gegensatz dazu ist

für die Spalthefe *S. pombe*, die jeweils nur einen Vertreter pro Subfamilie aufweist, bereits der Verlust des PMT2-Familienmitglieds letal (Willer, 2002).

Damit der Verlust einzelner PMT1- und/oder PMT2-Familienmitglieder überhaupt kompensiert werden kann, muss die Spezifität dieser Mannosyltransferasen gegenüber Proteinsubstraten grundsätzlich ähnlich sein. Die Charakterisierung mehrerer Akzeptorsubstrate legt den Schluss nahe, dass Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexe die selben Substrate mannosylieren, wobei Pmt1p-Pmt2p die Hauptaktivität darstellt. So sinkt die *in vitro* Aktivität, bei der die Übertragung eines Mannosylrestes von Dol-P-Man auf ein Akzeptorpeptid gemessen wird (Enzymtest II), in einer *pmt1pmt2* Mutante auf ca. 20 % (Gentzsch und Tanner, 1996). Darüber hinaus werden sekretorische Proteine, wie die Bar1-Protease (MacKay *et al.*, 1988), Ccw4p (covalently linked cell wall), Ccw5p (Mrsa *et al.*, 1997), Chitinase (Cts1p) (Kuranda und Robbins, 1991) und Kre9p (Killer-resistant) (Brown und Bussey, 1993) im *pmt1pmt2* Stamm nur noch unzureichend modifiziert. Im Gegensatz dazu kann in *pmt3*- oder *pmt5*-defizienten Stämmen weder *in vitro*, noch *in vivo* eine reduzierte O-Mannosylierungsrate nachgewiesen werden (Gentzsch und Tanner, 1997; Mrsa *et al.*, 1997). Allerdings beobachtet man bei der 3-fach Mutante *pmt1pmt2pmt3* einen weiteren Rückgang der *in vitro* Mannosyltransferase-Aktivität im Vergleich zu *pmt1pmt2*. Zudem ist Cts1p aufgrund der Dreifachdisruption stärker unterglykosyliert, als in der *pmt1pmt2* Doppelmutante (Gentzsch und Tanner, 1996, 1997). Dies zeigt, dass Pmt3p in der Lage ist, die selben Substrate zu modifizieren wie Pmt1p und Pmt2p. Vermutlich spielt Pmt3p erst dann eine wichtige Rolle, wenn Pmt1p und Pmt2p fehlen.

Des weiteren konnten Travers und Mitarbeiter zeigen, dass die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER aufgrund von Stressoren wie Tunicamycin oder DTT, eine erhöhte Genexpression von *PMT1*, *PMT2*, *PMT3* und *PMT5*, nicht aber von *PMT4* und *PMT6*, zur Folge hat (Travers *et al.*, 2000). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p *in vivo* ähnliche oder überlappende Funktionen ausüben.

Die Daten machen deutlich, dass Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexe die selben Proteinsubstrate mannosylieren, wobei Pmt5p-Pmt3p in Wildtypzellen möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielt. Fehlen Pmt1p und/oder Pmt2p, dann könnte der Pmt5p-Pmt3p Enzymkomplex den O-Mannosylierungsdefekt teilweise kompensieren. Eine ähnliche Funktion wäre für die alternativen Komplexe Pmt1p-Pmt3p und Pmt5p-Pmt2p

denkbar, die nur in geringer Menge im Wildtyp oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen detektierbar sind.

#### 4.1.2 Pmt6p-spezifische Enzymkomplexe

Die Aminosäuresequenz des dritten Mitglieds der PMT2-Subfamilie, Pmt6p, ist mit Pmt2p zu 46 % und mit Pmt3p zu 45 % identisch (Homologie 66 bzw. 69 %) (Gentzsch, 1996). Für Pmt6p gibt es keinerlei Hinweise, dass das Protein aus einer Genduplikation hervorgegangen sein könnte. Interessanterweise war Pmt6p, im Gegensatz zu Pmt2p und Pmt3p, nicht in der Lage, mit den Vertretern der PMT1-Familie zu interagieren. Darüber hinaus konnten Interaktionen mit den restlichen Mannosyltransferasen der PMT-Familie, sowie eine Homodimer-Bildung ausgeschlossen werden. Dennoch ließen sich hochmolekulare, Pmt6p-spezifische Proteinkomplexe durch chemische Quervernetzung mit *o*-Phtaldialdehyd (OPA) stabilisieren. Im Blaugel wurden ebenfalls hochmolekulare Proteinformen identifiziert, deren Laufverhalten durch das Fehlen von Pmt1p – Pmt5p nicht beeinflusst wurden (siehe Ergebnisse 3.1.2.6).

Diese Daten belegen, dass Pmt6p sehr wohl in der Lage ist, Protein/Protein Wechselwirkungen einzugehen und dass Pmt1p – Pmt6p nicht zu den Interaktionspartnern zählen. Welche anderen, ER-residenten Proteine mit Pmt6p interagieren ist derzeit nicht klar. Eine Möglichkeit wäre, dass Pmt7p mit der Mannosyltransferase einen Komplex bildet. Das siebte Mitglied der PMT-Familie in *S. cerevisiae* besitzt nur 19 % Sequenzidentität zu Pmt6p (Homologie 48 %) und lässt sich keiner der drei PMT-Subfamilien eindeutig zuordnen. Dennoch zeigt das Protein alle Merkmale der bisher charakterisierten Transferasen, wie ein nahezu identisches Hydropathieprofil, sowie PMT- und MIR-Domänen (siehe 1.1.1.2). *PMT7* ist nicht essentiell und die Gendisruption hat keinen Phänotyp zur Folge (Winzeler *et al.*, 1999). Das Protein wurde bisher nicht weiter charakterisiert. Es muss sich also erst noch zeigen, ob dieses *PMT*-Homologe tatsächlich Mannosyltransferase-Aktivität besitzt und ob es mit Pmt6p *in vivo* interagiert.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass Pmt6p mit anderen ER-residenten Proteinen einen Enzymkomplex bildet. Dies wäre innerhalb der PMT-Familie von *S. cerevisiae* einzigartig und könnte bedeuten, dass Pmt6p-spezifische Enzymkomplexe ein Aufgabenspektrum übernehmen, das sich von den Mannosyltransferasen Pmt1-5p unterscheidet. Divergierende Regulationsmechanismen wären ebenfalls denkbar. Tatsächlich besitzt

Pmt6p im Vergleich zu den Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexen, eine andere Substratspezifität. So wird beispielsweise Gas1p (Vai *et al.*, 1991), ein GPI-verankertes Protein in der Cytoplasmamembran, von Pmt6p, nicht aber von anderen Mitgliedern der PMT1- und PMT2-Subfamilie mannosyliert (Gentzsch und Tanner, 1996). Dies und die Tatsache, dass die Expression von *PMT6* bei ER-Stress nicht induziert wird, deutet darauf hin, dass die Enzyme in der Zelle unterschiedliche Funktionen oder Aufgabenbereiche übernehmen.

Protein/Protein Interaktionen mit den Proteinuntereinheiten der Oligosaccharyltransferase (OST) Ost1p (Silberstein *et al.*, 1995), Stt3p (Zufferey *et al.*, 1995) und Wbp1p (te Heesen *et al.*, 1993), sowie mit Sec61p (Deshaies und Schekman, 1987), das Teil des Translokons ist, konnten für Pmt6p ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Genetische Daten, die auf mögliche Wechselwirkungen mit anderen ER-residenten Proteinen hindeuten könnten, liegen derzeit nicht vor.

#### 4.1.3 Homomere Pmt4p Komplexe

Pmt4p unterscheidet sich von den PMT1- und PMT2-Familienmitgliedern in mehrfacher Hinsicht. Auffallend ist beispielsweise, dass diese Mannosyltransferase in allen bisher charakterisierten Organismen nicht redundant ist (Willer *et al.*, 2002). Des weiteren weisen die Vertreter der PMT4-Subfamilie signifikante Unterschiede in den Sequenzmotiven A – C (siehe Anhang I) der luminal orientierten Loop 5 Domäne auf (Girrbach *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass nur Pmt4p in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren und homomere Komplexe bildet. Bemerkenswert ist in diesem Fall, dass insgesamt zwei hochmolekulare, Pmt4p-spezifische Komplexe detektiert werden konnten (siehe Ergebnisse 3.1.3). Dies deutet darauf hin, dass Pmt4p nicht nur als Homodimer in der Zelle vorliegt, sondern auch Homotrimere und/oder Heterooligomere bilden kann. Bei den Mitgliedern der PMT1- und PMT2-Subfamilien war dieses Verhalten nicht zu beobachten. Ob weitere ER-lokalisierte Proteine mit dem Pmt4p-Pmt4p Dimer wechselwirken, ist derzeit nicht klar. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die Vertreter der PMT1- und PMT2-Subfamilien mit Pmt4p interagieren.

Dass Enzyme in unterschiedlichen Komplexen aktiv sein können, wird zum einen durch die hier präsentierten Ergebnisse bezüglich der PMT1- und PMT2-Subfamilien deutlich.



Zum anderen gibt es mehrere Beispiele für weitere Glykosyltransferase-Komplexe, wie z.B. die Golgi-lokalisierten Mannosyltransferase-Komplexe M-Pol I und M-Pol II. Beide Komplexe sind an der Modifikation N-gebundener Oligosaccharide beteiligt. M-Pol I setzt sich aus zwei und M-Pol II aus fünf Proteinuntereinheiten zusammen, wobei ausschließlich Mnn9p (Mannan) Teil beider Komplexe ist (Jungmann und Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999). Bisher konnte nur für M-Pol I gezeigt werden, dass die Mnn9p Untereinheit Mannosyltransferase-Aktivität besitzt (Stolz und Munro, 2002). Des weiteren zeigten Watanabe *et al.* (2000) und Maeda *et al.* (1998; 2000), dass das humane DPM2 als Untereinheit in zwei verschiedenen ER-residenten Glykosyltransferase-Komplexe aktiv ist (GPI-N-acetylglucosaminyltransferase (GPI-GnT) und Dol-P-Man Synthase). GPI-GnT initiiert die Biosynthese des Glykosylphosphatidylinositols (GPI), indem es GlcNAc von UDP-GlcNAc auf Phosphatidylinositol überträgt. Die Transferase setzt sich, inklusive DPM2, aus sechs Proteinuntereinheiten zusammen. Im Gegensatz dazu katalysiert die Dol-P-Man Synthase die Übertragungsreaktion eines Mannosylrestes von GDP-Man auf Dol-P. Die Synthase besteht, mit DPM2 aus insgesamt drei Untereinheiten. In beiden Fällen ist DPM2 der positive Regulator der Enzymkomplexe. Diese Beispiele machen deutlich, dass viele Glykosyltransferase-Komplexe modular aufgebaut sind, wobei einzelne Module von unterschiedlichen Komplexen genutzt werden. Dadurch können Transferasen mit verschiedenen Spezifitäten, Aktivitäten usw. generiert werden. Ein ähnliches Prinzip wäre für Pmt4p denkbar. Derzeit kann allerdings nur spekuliert werden, ob sich die homodimere Form von der oligomeren bezüglich ihrer Aktivität und/oder Spezifität unterscheidet.

Pmt4p zeigt im Vergleich zu den Mannosyltransferasen der PMT1- und PMT2-Subfamilie, eine andere Substratspezifität. Drei Glykoproteine – Axl2p (axiale Knospung) (Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996), Fus1p (Fusion) (Trueheart und Fink, 1989) und die Kex2-Protease (Wilcox und Fuller, 1991) – werden ausschließlich durch die Aktivität von Pmt4p modifiziert (Gentzsch und Tanner, 1997; Sanders *et al.*, 1999). Allerdings wurden auch überlappende Mannosyltransferase-Aktivitäten beobachtet, wie beispielsweise die Modifikation von Gas1p durch Pmt4p und Pmt6p (Gentzsch und Tanner, 1997). Pmt4p zeigt zusätzlich überlappende Substratspezifitäten mit Pmt1p und Pmt2p. So werden beispielsweise die beiden Sensorproteine Mid2p (mating induced cell death) und Wsc1p (cell wall integrity and stress response component) (Philip und Levin, 2001, Lommel und Strahl unveröffentlicht) von diesen Proteinen modifiziert.

Die Hinweise mehrten sich, dass die einzelnen Mannosyltransferasen unterschiedliche Serin/Threoninreste innerhalb eines Proteinsubstrats modifizieren. So konnten Ecker und Mitarbeiter zeigen, dass Pmt4p spezifische Serin- und Threoninreste in dem Zellwandprotein Ccw5p mannosyliert. Die beiden Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p modifizieren andere Hydroxy-Aminosäuren innerhalb von Ccw5p (Ecker *et al.*, 2003). Des weiteren ist Pmt2p in der Lage, einen mutierten  $\alpha$ -Faktor-Vorläufer, alleine, ohne die Aktion anderer PMT-Familienmitglieder zu mannosylieren (Harty *et al.*, 2001). Wie die Transferasekomplexe diese Aufgabe simultan an der naszierenden Polypeptidkette durchführen, wird bisher nicht verstanden.

#### 4.1.4 Effiziente Transferaseleistung durch Komplexbildung

Gentzsch und Tanner (1995) konnten zeigen, dass die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung für eine effiziente Transferaseleistung *in vitro* essentiell ist. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den gezielten Austausch geladener Aminosäuren für Pmt1p und für Pmt2p bestätigt. Die Substitution von Arginin 138 gegen Alanin oder Glutamat (R138A/E) in der zweiten Membranspanne (TM II) von Pmt1p führte zum Auseinanderfallen des Pmt1p-Pmt2p Komplexes. Dies hatte einen *in vitro* Aktivitätsverlust von ~95 % zur Folge. Somit ist Pmt2p nicht mehr in der Lage im *in vitro* Enzymtest die Mannosylreste effizient auf das Peptidsubstrat zu transferieren. Der gleiche Effekt wurde bei dem rekombinanten Protein Pmt1 E176R (TM III) beobachtet. Die Enzymaktivität der Punktmutanten Pmt2p R152E (TM II) und Pmt2p E190R (TM III) war ebenfalls stark beeinträchtigt (Restaktivität ~20 %). Auch hier können die mutierten Proteine aufgrund der Aminosäure-Substitution nicht mehr mit dem Interaktionspartner (Pmt1p) interagieren. Das bedeutet, dass Pmt1p unter diesen Bedingungen eine um 80 % reduzierte Transferrate aufweist. Interessanterweise war Pmt4p ebenfalls nicht mehr in der Lage mit sich selbst zu interagieren, als das strikt konservierte Arginin in der Membranspanne II (Arg142) gegen Glutamat ausgetauscht wurde. Das mutierte Protein Pmt4p R142E konnte zudem den temperatursensitiven Phänotyp einer *pmt1pmt4* Mutante nicht komplementieren, was auf eine stark eingeschränkte Transferaseleistung hindeutet. Hier ist allerdings nicht klar, ob der Verlust der Mannosyltransferase-Aktivität ausschließlich auf die gestörte Pmt4p-Pmt4p Komplexbildung zurückzuführen ist, oder ob die Mutation R142E per se zum Aktivitätsverlust beiträgt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die

Komplexbildung für Pmt1p und Pmt2p Grundvoraussetzung ist, um *in vitro* eine effiziente Transferaseleistung zu erzielen (siehe Ergebnisse 3.2). Für Pmt4p wäre ein ähnliches Prinzip vorstellbar.

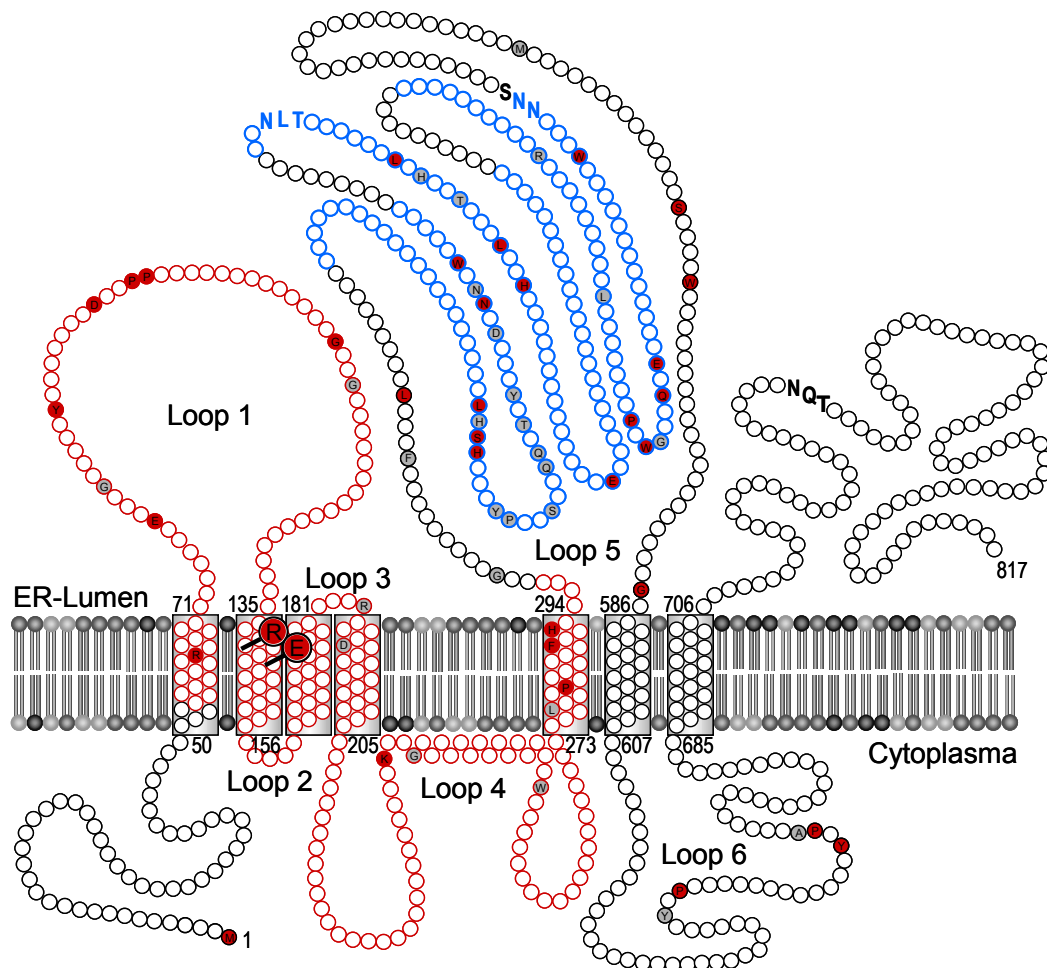
O-glykosylierte Proteine besitzen meist Serin/Threonin-reiche Domänen, die sehr stark mit Zuckerresten modifiziert werden. Diese Bereiche weisen aufgrund der Modifikationen vermutlich eine stabförmige Struktur auf, welche für die Funktion der Proteine notwendig ist (Jentoft, 1990). Da die O-Mannosylierung in Hefe in der Regel co-translational erfolgt, muss die O-Glykosylierung der Serin/Threonin-reichen Abschnitte mit sehr hoher Effizienz erfolgen. Genau dies könnte durch die Pmtp-Komplexe ermöglicht werden. Dass die Kooperation zwischen Glykosyltransferase-Molekülen eine Aktivitätssteigerung bewirken kann, wurde bereits für mehrere Glykosyltransferasen gezeigt. So z.B. für die Hamster UDP-GlcNAc:Dolichol-P GlcNAc-1-P Transferase (GPT) (Dan und Lehrman, 1997) oder die beiden Mannosyltransferase-Komplexe im Golgi-Apparat von *S. cerevisiae* – M-Pol I und M-Pol II (Jungmann und Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999; Stolz und Munro, 2002).

#### 4.1.5 Allgemeine Prinzipien der Pmtp-Pmtp Wechselwirkung

Die Punktmutagenese-Daten zeigen wie bereits erwähnt, dass die hoch konservierten Argininreste in den Membranspannen II von Pmt1p (Arg138), Pmt2p (Arg152) und Pmt4p (Arg142) für die Protein/Protein Wechselwirkungen essentiell sind. Für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung konnte zusätzlich eine Abhängigkeit von den negativ geladenen Glutamat-Resten in TM III (Glu176 bzw. Glu190) nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass sowohl die Bildung homodimerer, als auch heterodimerer Pmtp-Komplexe von denselben, strikt konservierten Aminosäuren innerhalb der PMT-Domäne abhängt (vgl. Abb. 4-2). Damit konnte für die Protein O-Mannosyltransferasen erstmals gezeigt werden, dass die Bildung der Enzymkomplexe nach denselben Prinzipien erfolgt.

In Hefe führt die Deletion von Pmt4p, in Kombination mit PMT1- und PMT2-Familienmitgliedern, zum Absterben der Zelle. Um also die O-Mannosylierung komplett zu unterdrücken, müssen sowohl Vertreter der PMT1/PMT2 Subfamilie, als auch der PMT4-Subfamilie inhibiert werden. Da die Bildung von Pmtp-Komplexen bei allen Mitgliedern nach demselben molekularen Mechanismus abläuft und diese Interaktionen für

die Aktivität essentiell sind, bietet sich hier die Möglichkeit einen Hemmstoff zu entwickeln, welcher die Komplexbildung der Pmtps spezifisch stört. Da Pflanzen im Gegensatz zu Pilzen und tierischen Organismen keine PMT-Homologen aufweisen, könnten hier Fungizide zur Bekämpfung phytopathogener Pilze gezielt eingesetzt werden.



**Abb. 4-2: Essentielle Aminosäuren für die Pmtp-Komplexbildung.** Gezeigt ist das Pmt1p Topologiemodell. Die für die Protein/Protein Interaktion essentiellen Aminosäuren Arg138 und Glu176 sind hervorgehoben. In Pmt2p sind die identischen Aminosäuren Arg152 und Glu190, und in Pmt4p Arg142 für die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Interaktionspartner notwendig. Der rot markierte Bereich von TM I – V wird als PMT-Domäne, und die blauen Bereiche als MIR-Domänen (Mannosyltransferase, IP<sub>3</sub>R, RyR) bezeichnet (siehe dazu Einleitung 1.1.1.2).

Für Pmt1p konnte zudem gezeigt werden, dass die positive Ladung an Position 138 für die Interaktion mit Pmt2p entscheidend ist (siehe Ergebnisse 3.2.1.2). Aufgrund dieser Tatsache kann man spekulieren, dass die positive Ladung zur Ausbildung einer Ionenbindung benötigt wird. Solche elektrostatischen Wechselwirkungen wurden bereits

für zahlreiche Protein/Protein Kontakte beschrieben; so z.B. für den Ras-Raf Komplex, der eine Signalkaskade für Zellwachstum und Differenzierung in Gang setzt (Sheinerman und Honig, 2002; Zeng *et al.*, 2002). Sehr gut untersucht sind auch die Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor Barstar, welcher mit der Ribonuklease Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* interagiert (Otzen und Fersht, 1999; Vaughan *et al.*, 1999; Sheinerman und Honig, 2002). In beiden Fällen tragen mehrere geladene Aminosäuren zur Protein/Protein Wechselwirkung bei. Für die Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung wäre ein analoges Prinzip denkbar.

Otzen und Fersht (1999) konnten zeigen, dass der Chymotrypsin Inhibitor 2 (CI2) zwei Argininreste für die Ausbildung intramolekularer Ionenbindungen benötigt. Der Austausch dieser Aminosäuren bewirkt eine Strukturänderung, aufgrund derer CI2 nicht mehr an die Protease Subtilisin binden kann. Ionenbindungen spielen somit nicht nur bei Protein/Protein Kontakten eine Rolle, sondern erfüllen auch eine strukturgebende Funktion innerhalb eines Moleküls. Für Pmt1p wurde dieser Fall durch eine gerichtete Mutagenese überprüft. Intramolekulare Ionenbindungen zwischen Arg138 und negativ geladenen Seitenketten in den Membranspannen III oder IV konnten so ausgeschlossen werden. Möglich wäre allerdings, dass Arg138 mit anderen Aminosäuren über intramolekulare Wasserstoffbrücken interagiert, um eine bestimmte Tertiärstruktur auszubilden. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass Arg138 keine strukturelle Funktion übernimmt, sondern den Pmt1p-Pmt2p Komplex durch direkten Kontakt mit dem Interaktionspartner stabilisiert.

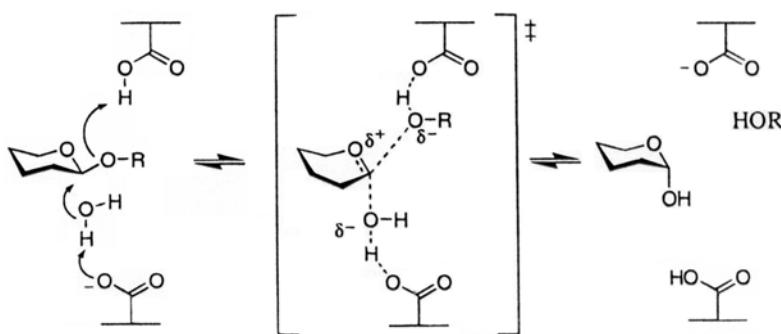
## 4.2 ESSENTIELLE AMINOSÄUREN INNERHALB VON PMT1P

Glykosyltransferasen müssen ihre Substrate erkennen, binden und im aktiven Zentrum korrekt ausrichten, um die Transferreaktion durchführen zu können. Spezifische Aminosäuren sind für diese Aufgaben nötig. Anhand von Pmt1p als Modellprotein wurde mit Hilfe gezielter Substitution hoch konservierter Aminosäuren gegen Alanin versucht, für die Katalyse wichtige Aminosäuren zu identifizieren. Vier Aminosäuren erwiesen sich für die Funktion der Mannosyltransferase als essentiell: Glu78 (Loop1), Leu314, Leu345 und Leu408 (Loop 5). Die entsprechenden Punktmutanten zeigten *in vitro* nur noch eine geringe Mannosyltransferase-Aktivität von weniger als 20 % (siehe Ergebnisse 3.3.1).

Ein Teil der in Leucin mutierten Pmt1-Enzyme wird O-glykosidisch, durch die Aktion von Pmt2p, modifiziert (siehe Ergebnisse 3.3.1.1). Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, dass der Aktivitätsverlust von ~85 % auf diese, für Pmt1p ungewöhnliche, Modifikation zurückzuführen ist. Denn zum einen liegen mehr als 50 % der rekombinanten Proteine in Wildtypform, also nicht mannosyliert vor. Zum anderen zeigt die vierte Leucin-Mutante L479A, die ebenfalls durch Pmt2p O-mannosyliert wird, eine deutlich höhere Restaktivität (> 40 %) als die L314A, L345A und L408A Mutanten. Aufgrund dieser Tatsachen kann man davon ausgehen, dass der Austausch von Leucin gegen Alanin direkten Einfluss auf die Enzymaktivität hat, wobei kleinere Veränderungen durch die O-Mannosylierung nicht ausgeschlossen werden können. Welche Serin- bzw. Threoninseitenketten durch Pmt2p modifiziert werden ist nicht klar. Unbekannt ist auch, ob die O-glykosidische Modifikation von Pmt1p co-translational, oder erst nach der Pmt1p-Pmt2p Komplexbildung erfolgt.

#### 4.2.1 Funktion von Glu-Resten bei der Katalyse von Glykosyltransferasen

Welche Rolle spielt Glu78 bei der Transferasereaktion? Für viele invertierende Glykosidasen und Glykosyltransferasen wurde ein allgemeiner Reaktionsmechanismus, der zwei essentielle Carboxylgruppen von Aspartat- oder Glutamatseitenketten als Säure/Base Katalysatoren einschließt, beschrieben (Abb. 4-3; siehe dazu auch Einleitung 1.2.2) (Ohtsubo *et al.*, 2000; Zechel und Withers, 2000; Bourne und Henrissat, 2001; Hu und Walker, 2002). Eine Carboxylgruppe fungiert als Basenkatalysator und greift das Wassermolekül an, während die zweite Carboxylgruppe säurekatalytisch bei der Zuckerspaltung assistiert.



**Abb. 4-3: Reaktionsmechanismus invertierender Glykosidasen.**  
Nach Zechel und Withers (2000).

Verfügen die Pmtps über einen ähnlichen Katalysemechanismus, dann würde die basenkatalytische Aminosäure des aktiven Zentrums bei der Deprotonierung der Hydroxylgruppe von Serin- oder Threoninseitenketten helfen, während die zweite, säurekatalytisch an der Spaltung der Bindung zwischen Mannose und Dol-P beteiligt ist.

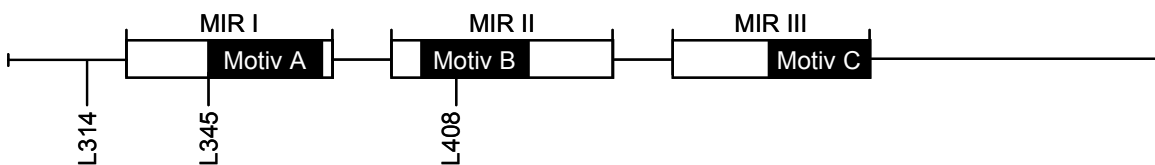
Pmt1p Glu78, das nach einer Sekundärstruktur-Vorhersage (JPRED; siehe 2.1.7) (Cuff *et al.*, 1998) in einem  $\beta$ -Faltblatt liegt (vgl. Anhang II), könnte eine Funktion als Säure/Base Katalysator bei der Übertragungsreaktion übernehmen. Der Austausch der funktionellen Carboxylgruppe gegen die Methylgruppe des Alanins (E78A), führt zu einem drastischen Aktivitätsverlust von ~87 %. Die Substitution einer an der Katalyse beteiligten Aminosäure, muss nicht zwingend zum vollständigen Aktivitätsverlust führen. So können beispielsweise nahe gelegene, negative Seitenketten einen Teil der Funktion übernehmen und damit den Verlust einer wichtigen Aminosäure kompensieren (Peracchi, 2001).

Negativ geladene Glutamat- und/oder Aspartatreste können auch andere Aufgaben bei der Übertragungsreaktion übernehmen. Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Ausrichtung von Zuckermolekülen im aktiven Zentrum (Gastinel *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2002; Ramakrishnan *et al.*, 2002). Im speziellen sind Aspartatreste im sogenannten DxD Motiv, für die Koordination eines Nukleotid-aktivierten Zuckerdonors über das assoziierte Metall-Ion ( $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$ ) und die Hydroxylgruppe der Ribose verantwortlich. Das DxD (auch DxH) Motiv ist insbesondere für Golgi-lokalisierte Glykosyltransferasen charakteristisch, die im allgemeinen Nukleotid-aktivierte Zuckerdonatoren verwenden und deren Transferasereaktion von divalenten Kationen abhängt (Breton und Imberty, 1999; Breton *et al.*, 2001). Für Enzyme, die Dol-P-aktivierte Zuckerdonatoren verwenden wurde ein derartiger Mechanismus noch nicht beschrieben.

Pmt1p besitzt insgesamt vier DxD bzw. DxH Motive; zwei im Loop 1 (D<sup>96</sup>VH und D<sup>118</sup>FD) und zwei im Loop 5 (D<sup>299</sup>GD und D<sup>436</sup>GD). Nur das DxH Motiv in Loop 1 ist innerhalb der PMT-Familie konserviert. Die Substitution von Asp96 führt allerdings nur zu einem moderaten Aktivitätsverlust von ~40 %. Eine direkte Beteiligung am Katalysemechanismus ist deshalb unwahrscheinlich.

#### 4.2.2 Funktion von Leu-Resten bei der Katalyse von Glykosyltransferasen

Die drei für die Funktion der Mannosyltransferase Pmt1p essentiellen Leucinreste sind im luminal orientierten Loop 5 lokalisiert. Leu345 und Leu408 sind Teil der hoch konservierten LHSN-Sequenz in den Motiven A bzw. B (vgl. Abb. 4-4). Leu314 liegt außerhalb der Konsensussequenzen A – C und der MIR-Domänen. Alle drei Aminosäuren sind innerhalb der PMT-Familie strikt konserviert.



**Abb. 4-4: Konservierte Domänen innerhalb des Loop 5 von Pmt1p.** Relative Lage der für die Funktion der Mannosyltransferase Pmt1p wichtigen Leu-Reste.

Nach einer Sekundärstruktur-Vorhersage (Zeller, 1999), befinden sich die Leucinreste in unstrukturierten Bereichen (siehe dazu auch Anhang II). Über die Funktion dieser Aminosäuren kann derzeit nur spekuliert werden.

Im Falle der  $\beta$ -Amylase aus Sojabohnen, einem Stärke spaltendem Enzym, konnte gezeigt werden, dass ein Leucinrest die Affinität zwischen Substrat und Enzym deutlich erhöht und so die Effizienz der Spaltungsreaktion gravierend beeinflusst (Totsuka und Fukazawa, 1996). Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von hydrophoben Leucinresten an enzymatischen Reaktionen sind die beiden Blutgruppenenzyme A ( $\alpha$ 3-GalNAc-Transferase) und B ( $\alpha$ 3-Gal-Transferase). Die Aminosäuresequenzen beider Glykosyltransferasen sind, mit Ausnahme von 4 Aminosäuren, absolut identisch. Leu266 verleiht dem Enzym A die Substratspezifität für GalNAc. Enzym B trägt an Position 266 ein Methionin, das seine Spezifität für Gal bedingt (Seto *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist Leucin die Aminosäure, welche am häufigsten an Protein/Protein Wechselwirkungen beteiligt ist (Janin *et al.*, 1988). Ähnliche Aufgaben sind für die funktionellen Gruppen von Leu314, Leu345 und Leu408 in Pmt1p denkbar.



### 4.2.3 Kompensatorische Effekte von Aminosäure-Substitutionen in Pmt1p

Der Austausch vieler strikt konservierter Aminosäuren wurde in mehreren Fällen bis zu einem gewissen Grad toleriert. So hatten beispielsweise die Punktmutanten Pmt1p D96A (Loop 1) oder L479A (Loop 5) nur einen moderaten Rückgang der Mannosyltransferase-Aktivität zur Folge. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass diese Aminosäuren bei der Katalyse nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Vorstellbar ist aber auch ein Kompensationsmechanismus, bei dem eine nahe gelegene funktionelle Gruppe die Funktion der substituierten Aminosäure übernimmt. Dies wurde schon bei zahlreichen Enzymen, die durch gezielte Mutagenese charakterisiert wurden, beobachtet. Beispielsweise ist im Wildtypprotein der Fructose-2,6-bisphosphatase ein Histidinrest (His256) direkt in die Phosphatase-Reaktion involviert. Die Substitution H256A hat jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Enzymaktivität, da in diesem Fall ein zweiter Histidinrest (His390) bei der Katalyse assistiert (Mizuguchi *et al.*, 1999; Yuen *et al.*, 1999).

Die Mannosyltransferase Pmt1p muss viele unterschiedliche Proteinsubstrate erkennen, wobei die Interaktion vermutlich über zahlreiche Kontaktpunkte vermittelt wird. Einzelne Aminosäure-Substitutionen hätten möglicherweise nur geringe Auswirkungen auf die Substratbindung, was den moderaten Aktivitätsverlust mehrerer rekombinanter Proteine erklären würde.

Welche Aufgaben die einzelnen Aminosäuren bei der Transferase-Reaktion übernehmen, kann mit letzter Sicherheit nur durch Strukturdaten eindeutig geklärt werden. In einem zukünftigen Projekt soll deshalb versucht werden, die hydrophile Loop 5 Domäne von Pmt1p heterolog in *E. coli* zu exprimieren um mit dem gereinigten Proteinfragment Strukturdaten mittels NMR (nuclear magnetic resonance)-Analyse zu erhalten.

## 4.3 PMT1P LOOP1 IST VERMUTLICH AN DER AKZEPTORBINDUNG BETEILIGT

Um die O-Mannosylierung in Hefe zu inhibieren, können – wie bereits erwähnt – Hemmstoffe entwickelt werden, welche die Pmt1p-Komplexbildung spezifisch stören. Eine weitere Möglichkeit wäre die Bindung von Substraten zu blockieren. Bei der Entwicklung von Medikamenten werden häufig fotoaktivierbare Liganden eingesetzt, um die genaue

Position der Ligandenbindestelle(n) bestimmen zu können (Dorman und Prestwich, 2000). Diese Erkenntnisse sind sehr hilfreich, wenn es darum geht, ganz gezielt therapeutisch wirksame Substanzen zu entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der im *in vitro* Enzymtest verwendete Mannose-Akzeptor, NH<sub>2</sub>-YATAVK(Biotin)-COOH, an die Loop 1 Domäne von Pmt1p bindet. Die Deletion des Loop 5 hat auf die Bindung des Peptids dagegen keinen Einfluss. Pmt1p Punktmutanten, welche im *in vitro* Enzymtest nur eine geringe Enzymaktivität aufweisen (E78A, L314A, L345A und L408A), sind nicht mehr in der Lage, das Peptidsubstrat effizient zu binden. Dies deutet darauf hin, dass die funktionellen Gruppen der Aminosäuren Glu78, Leu314, Leu345 und Leu408 bei der Peptidbindung und/oder Koordination eine wichtige Rolle spielen (siehe Ergebnisse 3.3.2). Interessanterweise zeigen die Leucin-Substitutionen, welche den Loop 5 betreffen, eine gestörte Peptidbindung, obwohl der gesamte Loop 5 dafür nicht notwendig ist. Dieses Verhalten kann durch unterschiedliche Modelle erklärt werden.

i) Möglich wäre, dass der Austausch der Aminosäuren zu einer Konformationsänderung innerhalb des Enzyms führt und dadurch der Zugang zu der Peptidbindestelle blockiert wird. Fehlt dagegen der gesamte Loop5, dann ist die Bindedomäne wieder frei zugänglich. Somit wäre der Aktivitätsverlust der Punktmutanten ein indirekter Effekt, der auf eine Strukturänderung zurückzuführen ist.

ii) Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Leucinreste für die Koordination und/oder Stabilisierung des Hexapeptids verantwortlich sind. Dies würde bedeuten, dass sich Loop 1 und 5 annähern und zusammen ein aktives Zentrum bilden. Dass beide Domänen für die Funktion des Enzyms absolut essentiell sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit und von Strahl-Bolsinger und Scheinost gezeigt werden (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Fehlt, wie in der Pmt1p  $\Delta$ Loop 5 Mutante, der zentrale hydrophile Bereich – und somit auch die funktionellen Gruppen der Leucine – dann wäre eine gezielte Ausrichtung des Hexapeptids nicht mehr möglich. Dies würde auch erklären, weshalb das mutierte Pmt1p  $\Delta$ Loop5 Konstrukt nach der lichtinduzierten Quervernetzungsreaktion keine distinkte, Biotin-spezifische Bande im Western Blot aufweist. In diesem Fall binden möglicherweise mehrere Peptide unkoordiniert an die Loop 1 Domäne von Pmt1p.

Für Glu78 in Loop 1 ist eine Beteiligung an der Peptidbindung und/oder eine strukturelle Funktion ebenfalls denkbar.

Der Einsatz fotoaktivierbarer Liganden, in Kombination mit gezielten Substitutionen von Aminosäuren, stellt eine gute Methode dar, um mehr über die Protein/Liganden bzw. Enzym/Substrat Wechselwirkung zu lernen. Mit diesem System konnte beispielsweise durch Verwendung fotoreaktiver GlcNAc-Analoga, Information über die Zuckerbindestelle in der  $\beta$ 1,4-Galaktosyltransferase gewonnen werden (Hatanaka *et al.*, 2001). Yan und Lennarz (2002a; 2002b) gelang es, durch Verwendung unterschiedlicher Akzeptorpeptide mit integrierten fotoaktivierbaren Gruppen, die Akzeptorbindestelle in der Stt3p-Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes zu lokalisieren. Ein ähnlicher Ansatz, bei dem  $\alpha$ -Faktor-Analoga mit integrierten fotoreaktiven Gruppen eingesetzt wurden, konnte die Bindestelle des Peptidpheromons auf dem Ste2p (steril) Rezeptor in der Bäckerhefe eingegrenzt werden (Henry *et al.*, 2002).

Die hier gezeigten Daten machen deutlich, dass sowohl Loop 1, als auch spezifische Aminosäurereste der Loop 5 Domäne für die Bindung des Peptidsubstrats notwendig sind. Beide hydrophile Domänen sind für die Transferasereaktion essentiell. Es kann somit spekuliert werden, dass sich zwischen der Zwei-Domänenstruktur (Loop 1 und Loop 5) das aktive Zentrum des Enzyms Pmt1p befindet. Naszierende Polypeptidketten könnten möglicherweise zwischen den Loop 1 und Loop 5 Domänen weitertransportiert werden um so einen effizienten Zuckertransfer zu gewährleisten.

Strukturdaten müssen zeigen, ob diese Modellvorstellung für die Protein O-Mannosyltransferasen zutrifft.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Protein O-Mannosyltransferasen (Pmtps) der Bäckerhefe *S. cerevisiae* katalysieren den Transfer eines Mannosylrestes von Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man) auf Serin- und Threoninseitenketten sekretorischer Proteine. Diese Proteinmodifikation ist für Hefezellen essentiell. Inhalt dieser Arbeit ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der PMT-Familienmitglieder Pmt1p bis Pmt6p in *S. cerevisiae*.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass alle Mitglieder der PMT-Familie in *S. cerevisiae* hochmolekulare Enzymkomplexe bilden. Diese Protein/Protein Wechselwirkungen sind Grundvoraussetzung für eine effiziente Transferaseleistung aller Pmtps.

Die Vertreter der PMT1-Subfamilie (Pmt1p und Pmt5p) interagieren spezifisch mit den Vertretern der PMT2-Subfamilie (Pmt2p und Pmt3p). Die heteromeren Pmt1p-Pmt2p und Pmt5p-Pmt3p Komplexe sind in der Wildtyp-Hefe dominant. Pmt1p-Pmt3p bzw. Pmt5p-Pmt2p Komplexe werden dagegen nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen beobachtet. Diese "alternativen" Enzymkomplexe übernehmen beim Verlust eines favorisierten Interaktionspartners eine kompensatorische Funktion, um ein Mindestmaß an Mannosyltransferase-Aktivität in der Zelle zu gewährleisten. Protein/Protein Wechselwirkungen innerhalb der PMT1- bzw. PMT2-Subfamilien wurden nicht beobachtet.

Pmt6p, das dritte Mitglied der PMT2-Subfamilie, interagiert weder mit sich selbst, noch mit den Mannosyltransferasen Pmt1-5p. Dennoch ist Pmt6p in der Lage hochmolekulare Enzymkomplexe *in vivo* auszubilden. Die Komponenten Pmt6p-spezifischer Enzymkomplexe müssen noch identifiziert werden.

Die PMT4-Subfamilie ist, im Vergleich zu den beiden anderen Subfamilien, nicht redundant. Pmt4p interagiert mit sich selbst um homomere Pmt4p-Pmt4p Komplexe zu bilden. Zudem wurden zwei hochmolekulare, Pmt4p-spezifische Enzymkomplexe detektiert. Pmt4p bildet somit neben der homodimeren Form auch Homotrimere und/oder Heterooligomere aus.

Die geladenen Aminosäuren in den Transmembranspannen (TM) II und III von Pmt1p (Arg138 bzw. Glu176) und Pmt2p (Arg152 bzw. Glu190) erwiesen sich für die Pmt1p-

Pmt2p Komplexbildung als essentiell. Zudem konnte gezeigt werden, dass die positive Ladung an Position 138 von Pmt1p für die Interaktion mit Pmt2p eine entscheidende Rolle spielt.

Der Austausch der zu 100 % konservierten Aminosäure Arg142 in der TM II von Pmt4p verhindert ebenfalls die Komplexbildung zweier Pmt4p-Moleküle. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl die heteromere, als auch die homomere Protein/Protein Wechselwirkung der PMT-Familienmitglieder nach demselben Grundprinzip erfolgt.

Pmt1p und Pmt2p sind in der Lage *in vitro* einen Mannosylrest von Dol-P-Man auf die Threoninseitenkette des Pentapeptides Ac-YATAV-NH<sub>2</sub> zu übertragen. Durch die Einführung einer fotoreaktiven Gruppe in ein modifiziertes Peptid, wurden die an der Substratbindung beteiligten Domänen innerhalb von Pmt1p charakterisiert. Die hier präsentierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zwei hydrophile, zum ER-Lumen orientierte Domänen für die Peptidbindung essentiell sind.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abeijon, C. und Hirschberg, C.B.** (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **17**, 32-36.
- Babczinski, P. und Tanner, W.** (1973). Involvement of dolicholmonophosphate in the formation of specific mannosyl-linkages in yeast glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **54**, 1119-1124.
- Baenziger, J.U. und Fiete, D.** (1982). Photoactivatable glycopeptide reagents for site-specific labeling of lectins. *J Biol Chem* **257**, 4421-4425.
- Bause, E. und Lehle, L.** (1979). Enzymatic N-glycosylation and O-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast. *Eur J Biochem* **101**, 531-540.
- Beltran-Valero de Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van Der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W.B., Cormand, B., Lehesjoki, A.E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C.A., Van Bokhoven, H. und Brunner, H.G.** (2002). Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* **71**, 1033-1043.
- Ben-Neriah, Y.** (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* **3**, 20-26.
- Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C. und Hill, R.L.** (1981). Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **52**, 23-175.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bourdineaud, J.P., van der Vaart, J.M., Donzeau, M., de Sampaio, G., Verrips, C.T. und Lauquin, G.J.** (1998). Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**, 85-98.
- Bourne, Y. und Henrissat, B.** (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 593-600.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Breton, C. und Imberty, A.** (1999). Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 563-571.
- Breton, C., Mucha, J. und Jeanneau, C.** (2001). Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* **83**, 713-718.

- Brockhausen, I.** (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 67-95.
- Brown, J.L. und Bussey, H.** (1993). The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol Cell Biol* **13**, 6346-6356.
- Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J., Odds, F.C. und Gow, N.A.** (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7670-7675.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V. und Henrissat, B.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **326 ( Pt 3)**, 929-939.
- Carraway, K.L. und Hull, S.R.** (1991). Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* **1**, 131-138.
- Charnock, S.J. und Davies, G.J.** (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* **38**, 6380-6385.
- Chattopadhyay, A., James, H.L. und Fair, D.S.** (1992). Molecular recognition sites on factor Xa which participate in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* **267**, 12323-12329.
- Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A. und Endo, T.** (1997). Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* **272**, 2156-2162.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. und Hieter, P.** (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.
- Colley, K.J.** (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13.
- Colley, K.J. und Baenziger, J.U.** (1987). Identification of the post-translational modifications of the core-specific lectin. The core-specific lectin contains hydroxyproline, hydroxylysine, and glucosylgalactosylhydroxylysine residues. *J Biol Chem* **262**, 10290-10295.
- Cozzone, A.J.** (1998). Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie* **80**, 43-48.
- Cuff, J.A., Clamp, M.E., Siddiqui, A.S., Finlay, M. und Barton, G.J.** (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* **14**, 892-893.
- Dan, N. und Lehrman, M.A.** (1997). Oligomerization of hamster UDP-GlcNAc:dolichol-P GlcNAc-1-P transferase, an enzyme with multiple transmembrane spans. *J Biol Chem* **272**, 14214-14219.

- Dan, N., Middleton, R.B. und Lehrman, M.A.** (1996). Hamster UDP-N-acetylglucosamine:dolichol-P N-acetylglucosamine-1-P transferase has multiple transmembrane spans and a critical cytosolic loop. *J Biol Chem* **271**, 30717-30724.
- de Beer, T., Vliegthart, J.F., Löffler, A. und Hofsteenge, J.** (1995). The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase U<sub>s</sub> is alpha-mannopyranose. *Biochemistry* **34**, 11785-11789.
- Deshaies, R.J. und Schekman, R.** (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **105**, 633-645.
- Dorman, G. und Prestwich, G.D.** (2000). Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* **18**, 64-77.
- Duman, J.G., Miele, R.G., Liang, H., Grella, D.K., Sim, K.L., Castellino, F.J. und Bretthauer, R.K.** (1998). O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol Appl Biochem* **28 ( Pt 1)**, 39-45.
- Dunn, S.D.** (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144-153.
- Ecker, M., Mersa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. und Tanner, W.** (2003). Protein O-mannosylation precedes and potentially controls N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep im Druck*.
- Ernst, J.F. und Prill, S.K.** (2001). O-glycosylation. *Med Mycol* **39 Suppl 1**, 67-74.
- Finley, D. und Varshavsky, A.** (1985). The ubiquitin system: functions and mechanisms. *Trends Biochem Sci* **10**, 343-346.
- Frank, C.** (2000). Die Bedeutung der Protein-O-Mannosylierung für die Pheromonantwort bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit, Regensburg*.
- Freiman, R.N. und Tjian, R.** (2003). Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* **112**, 11-17.
- Fu, J., Ren, M. und Kreibich, G.** (1997). Interactions among subunits of the oligosaccharyltransferase complex. *J Biol Chem* **272**, 29687-29692.
- Fu, M., Wang, C., Wang, J., Zafonte, B.T., Lisanti, M.P. und Pestell, R.G.** (2002). Acetylation in hormone signaling and the cell cycle. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 259-276.
- Füllekrug, J. und Nilsson, T.** (1998). Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 77-84.
- Gastinel, L.N., Cambillau, C. und Bourne, Y.** (1999). Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J* **18**, 3546-3557.
- Gastinel, L.N., Bignon, C., Misra, A.K., Hindsgaul, O., Shaper, J.H. und Joziase, D.H.** (2001). Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and



- its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *EMBO J* **20**, 638-649.
- Gemmill, T.R. und Trimble, R.B.** (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 227-237.
- Gentzsch, M.** (1996). Die Bedeutung der Protein O-Glykosylierung für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation, Regensburg*.
- Gentzsch, M. und Tanner, W.** (1996). The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J* **15**, 5752-5759.
- Gentzsch, M. und Tanner, W.** (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**, 481-486.
- Gentzsch, M., Immervoll, T. und Tanner, W.** (1995). Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein O-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Lett* **377**, 128-130.
- Gibson, R.P., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Lloyd, R. und Davies, G.J.** (2002). Insights into Trehalose Synthesis Provided by the Structure of the Retaining Glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol* **9**, 1337-1346.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. und Schiestl, R.H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Girrbach, V.** (1999). Charakterisierung der Interaktion zwischen Protein O-Mannosyltransferasen (Pmts). *Diplomarbeit, Regensburg*.
- Girrbach, V. und Strahl, S.** (2003). Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**, 12554-12562.
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. und Strahl-Bolsinger, S.** (2000). Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**, 19288-19296.
- Goffeau, A.** (1996). 1996: a vintage year for yeast and Yeast. *Yeast* **12**, 1603-1605.
- Graham, T.R., Seeger, M., Payne, G.S., MacKay, V.L. und Emr, S.D.** (1994). Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **127**, 667-678.
- Gu, Z., Steinmetz, L.M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R.W. und Li, W.H.** (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**, 63-66.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y. und Walker, S.** (2000). The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci* **9**, 1045-1052.
- Halme, A., Michelitch, M., Mitchell, E.L. und Chant, J.** (1996). Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr Biol* **6**, 570-579.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

- Hanisch, F.G.** (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* **382**, 143-149.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*.
- Harris, R.J., Ling, V.T. und Spellman, M.W.** (1992). O-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. *J Biol Chem* **267**, 5102-5107.
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. und Kelly, W.G.** (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* **58**, 841-874.
- Harty, C., Strahl, S. und Römisch, K.** (2001). O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell* **12**, 1093-1101.
- Haselbeck, A. und Tanner, W.** (1982). Dolichyl phosphate-mediated mannosyl transfer through liposomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1520-1524.
- Haselbeck, A. und Tanner, W.** (1983). O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **158**, 335-338.
- Hatanaka, Y., Ishiguro, M., Hashimoto, M., Gastinel, L.N. und Nakagomi, K.** (2001). A model of photoprobe docking with beta1,4-galactosyltransferase identifies a possible carboxylate involved in glycosylation steps. *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 411-413.
- Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C.E. und Robbins, P.W.** (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6846-6850.
- Haynes, P.A.** (1998). Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* **8**, 1-5.
- Henry, L.K., Khare, S., Son, C., Babu, V.V., Naider, F. und Becker, J.M.** (2002). Identification of a contact region between the tridecapeptide alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* and its G protein-coupled receptor by photoaffinity labeling. *Biochemistry* **41**, 6128-6139.
- Herscovics, A. und Orlean, P.** (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* **7**, 540-550.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807.
- Higuchi, R.** (1990). PCR Protocols: A guide to methods and applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J., Eds). *Academic Press Inc., San Diego, USA*, 177-183.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. und Tzagoloff, A.** (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163-167.
- Hoffman, C.S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

- Hofsteenge, J., Müller, D.R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W.J. und Vliegenthart, J.F. (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry* **33**, 13524-13530.
- Hu, Y. und Walker, S. (2002). Remarkable Structural Similarities between Diverse Glycosyltransferases. *Chem Biol* **9**, 1287-1296.
- Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., Mokhtarzadeh, M. und Walker, S. (2003). Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 845-849.
- Immervoll, T., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1995). PMT3 and PMT4, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1345-1351.
- Janin, J., Miller, S. und Chothia, C. (1988). Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J Mol Biol* **204**, 155-164.
- Jars, M.U., Osborn, S., Forstrom, J. und MacKay, V.L. (1995). N- and O-glycosylation and phosphorylation of the bar secretion leader derived from the barrier protease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 24810-24817.
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**, 291-294.
- Jigami, Y. und Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 335-345.
- Joseph, S.K., Pierson, S. und Samanta, S. (1995). Trypsin digestion of the inositol trisphosphate receptor: implications for the conformation and domain organization of the protein. *Biochem J* **307** ( Pt 3), 859-865.
- Jungmann, J. und Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J* **17**, 423-434.
- Jungmann, J., Rayner, J.C. und Munro, S. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J Biol Chem* **274**, 6579-6585.
- Jurado, L.A., Coloma, A. und Cruces, J. (1999). Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* **58**, 171-180.
- Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H. und Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373-383.
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J. und Gilmore, R. (1997). The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem* **272**, 32513-32520.

- Ketela, T., Green, R. und Bussey, H.** (1999). Saccharomyces cerevisiae mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* **181**, 3330-3340.
- Kieliszewski, M.J., O'Neill, M., Leykam, J. und Orlando, R.** (1995). Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinosylation. *J Biol Chem* **270**, 2541-2549.
- Kim, H., Park, H., Montalvo, L. und Lennarz, W.J.** (2000). Studies on the role of the hydrophobic domain of Ost4p in interactions with other subunits of yeast oligosaccharyl transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1516-1520.
- Kinoshita, T., Ohishi, K. und Takeda, J.** (1997). GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J Biochem (Tokyo)* **122**, 251-257.
- Kiselyov, K. und Muallem, S.** (1999). Fatty acids, diacylglycerol, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptors and Ca<sup>2+</sup> influx. *Trends Neurosci* **22**, 334-337.
- Klar, J.** (1999). Identifizierung und Charakterisierung von Protein O-Mannosyltransferase-Komplexen in Saccharomyces cerevisiae. *Diplomarbeit, Regensburg*.
- Knauer, R. und Lehle, L.** (1999a). 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* **274**, 17249-17256.
- Knauer, R. und Lehle, L.** (1999b). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 259-273.
- Kobata, A.** (2000). A journey to the world of glycobiology. *Glycoconj J* **17**, 443-464.
- Kornfeld, R. und Kornfeld, S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-664.
- Koshland, D.E.J.** (1987). Switches, thresholds and ultrasensitivity. *Trends Biochem Sci* **12**, 225-229.
- Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D. und Hofsteenge, J.** (1998). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol Biol Cell* **9**, 301-309.
- Krieg, U.C., Walter, P. und Johnson, A.E.** (1986). Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8604-8608.
- Kuranda, M.J. und Robbins, P.W.** (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **266**, 19758-19767.
- Laemmli, U.K. und King, J.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lala, A., Sojar, H.T. und De Nardin, E.** (1996). Quantitative approach for detection and characterization of formyl peptide receptor in solution using a photoaffinity ligand. *Pept Res* **9**, 58-60.
- Larriba, G., Elorza, M.V., Villanueva, J.R. und Sentandreu, R.** (1976). Participation of dolichol phospho-mannose in the glycosylation of yeast wall manno-proteins at the polysomal level. *FEBS Lett* **71**, 316-320.
- Lechner, J. und Wieland, F.** (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 173-194.
- Lehle, L. und Tanner, W.** (1978). Glycosyl transfer from dolichyl phosphate sugars to endogenous and exogenous glycoprotein acceptors in yeast. *Eur J Biochem* **83**, 563-570.
- Lehle, L. und Tanner, W.** (1995). Protein glycosylation in yeast. In: Montreuil, J., Schachter, H. und Vliegenhart, J. F. G. (Hrsg.). *Glycoproteins*. Elsevier, Amsterdam, New York, **29a**, 475-509.
- Lewis, R.V., Roberts, M.F., Dennis, E.A. und Allison, W.S.** (1977). Photoactivated heterobifunctional cross-linking reagents which demonstrate the aggregation state of phospholipase A2. *Biochemistry* **16**, 5650-5654.
- Lis, H. und Sharon, N.** (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **218**, 1-27.
- Lodder, A.L., Lee, T.K. und Ballester, R.** (1999). Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 1487-1499.
- Luria, S.E., Adams, J.N. und Ting, R.C.** (1960). Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* **12**, 348-390.
- Lussier, M., Sdicu, A.M. und Bussey, H.** (1999). The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 323-334.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Ketela, T. und Bussey, H.** (1995a). Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J Cell Biol* **131**, 913-927.
- Lussier, M., Gentzsch, M., Sdicu, A.M., Bussey, H. und Tanner, W.** (1995b). Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J Biol Chem* **270**, 2770-2775.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussereau, F., Jacquet, M. und Bussey, H.** (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem* **272**, 15527-15531.
- Ly, H.D. und Withers, S.G.** (1999). Mutagenesis of glycosidases. *Annu Rev Biochem* **68**, 487-522.

- Lynch, M. und Conery, J.S.** (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151-1155.
- MacKay, V.L., Welch, S.K., Insley, M.Y., Manney, T.R., Holly, J., Saari, G.C. und Parker, M.L.** (1988). The *Saccharomyces cerevisiae* BAR1 gene encodes an exported protein with homology to pepsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 55-59.
- MacKrell, J.J.** (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channel function. *Biochem J* **337** ( Pt 3), 345-361.
- Maeda, Y., Tomita, S., Watanabe, R., Ohishi, K. und Kinoshita, T.** (1998). DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate. *EMBO J* **17**, 4920-4929.
- Maeda, Y., Tanaka, S., Hino, J., Kangawa, K. und Kinoshita, T.** (2000). Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3. *EMBO J* **19**, 2475-2482.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. und Sudarsanam, S.** (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27**, 514-520.
- Marcus, S.L., Polakowski, R., Seto, N.O., Leinala, E., Borisova, S., Blancher, A., Roubinet, F., Evans, S.V. und Palcic, M.M.** (2003). A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase. *J Biol Chem* **278**, 12403-12405.
- Marriott, M. und Tanner, W.** (1979). Localization of dolichyl phosphate- and pyrophosphate-dependent glycosyl transfer reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **139**, 566-572.
- Martin-Blanco, E. und Garcia-Bellido, A.** (1996). Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6048-6052.
- McCarter, J.D. und Withers, S.G.** (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 885-892.
- Mehta, D.P., Ichikawa, M., Salimath, P.V., Etchison, J.R., Haak, R., Manzi, A. und Freeze, H.H.** (1996). A lysosomal cysteine proteinase from *Dictyostelium discoideum* contains N-acetylglucosamine-1-phosphate bound to serine but not mannose-6-phosphate on N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **271**, 10897-10903.
- Menon, A.K., Baumann, N.A., van't Hof, W. und Vidugiriene, J.** (1997). Glycosylphosphatidylinositols: biosynthesis and intracellular transport. *Biochem Soc Trans* **25**, 861-865.
- Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T. und Hendershot, L.M.** (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* **13**, 4456-4469.

- Miao, J., Irrgang, K.D., Salnikow, J., Franke, P. und Vater, J. (1998). Close vicinity of Lhc b1 and Lhc b4 in Photosystem II--membrane fragments as verified by chemical cross-linking. *Eur J Biochem* **257**, 586-591.
- Mizuguchi, H., Cook, P.F., Tai, C.H., Hasemann, C.A. und Uyeda, K. (1999). Reaction mechanism of fructose-2,6-bisphosphatase. A mutation of nucleophilic catalyst, histidine 256, induces an alteration in the reaction pathway. *J Biol Chem* **274**, 2166-2175.
- Morera, S., Lariviere, L., Kurzeck, J., Aschke-Sonnenborn, U., Freemont, P.S., Janin, J. und Ruger, W. (2001). High resolution crystal structures of T4 phage beta-glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J Mol Biol* **311**, 569-577.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154.
- Muir, L. und Lee, Y.C. (1970). Glycopeptides from earthworm cuticle collagen. *J Biol Chem* **245**, 502-509.
- Mulichak, A.M., Losey, H.C., Walsh, C.T. und Garavito, R.M. (2001). Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure (Camb)* **9**, 547-557.
- Munro, S. (2001). What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett* **498**, 223-227.
- Nakajama, T. und Ballou, C.E. (1974). Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J Biol Chem* **249**, 7679-7684.
- Nakayama, K., Feng, Y., Tanaka, A. und Jigami, Y. (1998). The involvement of *mnx4* and *mnx6* mutations in mannosylphosphorylation of O-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 255-262.
- Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. und Jigami, Y. (1992). OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J* **11**, 2511-2519.
- Nishimura, H., Kawabata, S., Kisiel, W., Hase, S., Ikenaka, T., Takao, T., Shimonishi, Y. und Iwanaga, S. (1989). Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl2-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. *J Biol Chem* **264**, 20320-20325.
- Odani, T., Shimma, Y., Tanaka, A. und Jigami, Y. (1996). Cloning and analysis of the *MNX4* gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**, 805-810.
- O'Donnell, N. (2002). Intracellular glycosylation and development. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 336-345.

- Ohtsubo, K., Imajo, S., Ishiguro, M., Nakatani, T., Oka, S. und Kawasaki, T. (2000). Studies on the structure-function relationship of the HNK-1 associated glucuronyltransferase, GlcAT-P, by computer modeling and site-directed mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)* **128**, 283-291.
- Olmsted, J.B. (1981). Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem* **256**, 11955-11957.
- Opat, A.S., Houghton, F. und Gleeson, P.A. (2000). Medial Golgi but not late Golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. Role of luminal domain in complex formation and localization. *J Biol Chem* **275**, 11836-11845.
- Opat, A.S., van Vliet, C. und Gleeson, P.A. (2001). Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes. *Biochimie* **83**, 763-773.
- Oriol, R., Martinez-Duncker, I., Chantret, I., Mollicone, R. und Codogno, P. (2002). Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate. *Mol Biol Evol* **19**, 1451-1463.
- Orlean, P. (1990). Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 5796-5805.
- Orlean, P., Albright, C. und Robbins, P.W. (1988). Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J Biol Chem* **263**, 17499-17507.
- Otzen, D.E. und Fersht, A.R. (1999). Analysis of protein-protein interactions by mutagenesis: direct versus indirect effects. *Protein Eng* **12**, 41-45.
- Palamarczyk, G., Maras, M., Contreras, R. und Kruszewska, J. (1998). Protein secretion and glycosylation in *Trichoderma*. In: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (eds) *Trichoderma and Glocladium. Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor and Francis, London **1**, 121-138.
- Pedersen, L.C., Darden, T.A. und Negishi, M. (2002). Crystal structure of beta 1,3-glucuronyltransferase I in complex with active donor substrate UDP-GlcUA. *J Biol Chem* **277**, 21869-21873.
- Pedersen, L.C., Tsuchida, K., Kitagawa, H., Sugahara, K., Darden, T.A. und Negishi, M. (2000). Heparan/chondroitin sulfate biosynthesis. Structure and mechanism of human glucuronyltransferase I. *J Biol Chem* **275**, 34580-34585.
- Peracchi, A. (2001). Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. *Trends Biochem Sci* **26**, 497-503.
- Philip, B. und Levin, D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**, 271-280.
- Pi, J., Chow, H. und Pittard, A.J. (2002). Study of second-site suppression in the pheP gene for the phenylalanine transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 5842-5847.



- Ponting, C.P.** (2000). Novel repeats in ryanodine and IP<sub>3</sub> receptors and protein O-mannosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **25**, 48-50.
- Ramakrishnan, B., Balaji, P.V. und Qasba, P.K.** (2002). Crystal structure of beta1,4-galactosyltransferase complex with UDP-Gal reveals an oligosaccharide acceptor binding site. *J Mol Biol* **318**, 491-502.
- Redding, K., Holcomb, C. und Fuller, R.S.** (1991). Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**, 527-538.
- Reid, K.B.** (1979). Complete amino acid sequences of the three collagen-like regions present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* **179**, 367-371.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M. und Emr, S.D.** (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **8**, 4936-4948.
- Roemer, T., Madden, K., Chang, J. und Snyder, M.** (1996). Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev* **10**, 777-793.
- Romero, P.A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A.M., Herscovics, A. und Bussey, H.** (1999). Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**, 1045-1051.
- Roth, J.** (1987). Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **906**, 405-436.
- Ruoslahti, E.** (1988). Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 229-255.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. und Makarow, M.** (1992). A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8857.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*.
- Sanders, S.L., Gentzsch, M., Tanner, W. und Herskowitz, I.** (1999). O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J Cell Biol* **145**, 1177-1188.
- Sasaki, T., Yamada, H., Matsumura, K., Shimizu, T., Kobata, A. und Endo, T.** (1998). Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 599-606.
- Sato, C., Kim, J.H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S. und Kohda, D.** (2000). Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 65-72.

- Schäffer, C., Graninger, M. und Messner, P. (2001). Prokaryotic glycosylation. *Proteomics* **1**, 248-261.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Schägger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**, 220-230.
- Schermer, U. (2002). Charakterisierung von durch O-Mannosylierungsdefekte induzierten Signaltransduktionswegen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit, Regensburg*.
- Schröder, S., Schimmöller, F., Singer-Krüger, B. und Riezman, H. (1995). The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP. *J Cell Biol* **131**, 895-912.
- Sentandreu, R. und Northcote. (1969). The characterization of oligosaccharide attachment to threonine and serine in mannan glycopeptides obtained from the cell wall of yeast. *Carbohydr Res* **10**, 584-585.
- Seoighe, C. und Wolfe, K.H. (1999). Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* **238**, 253-261.
- Seto, N.O., Compston, C.A., Evans, S.V., Bundle, D.R., Narang, S.A. und Palcic, M.M. (1999). Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **259**, 770-775.
- Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L. und Tanner, W. (1974). The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **46**, 35-41.
- Sheinerman, F.B. und Honig, B. (2002). On the role of electrostatic interactions in the design of protein-protein interfaces. *J Mol Biol* **318**, 161-177.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. und Huse, W.D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-7600.
- Silberstein, S., Collins, P.G., Kelleher, D.J., Rapiejko, P.J. und Gilmore, R. (1995). The alpha subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex is essential for vegetative growth of yeast and is homologous to mammalian ribophorin I. *J Cell Biol* **128**, 525-536.
- Sinnot, M.L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202.
- Smalheiser, N.R., Haslam, S.M., Sutton-Smith, M., Morris, H.R. und Dell, A. (1998). Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X

- structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J Biol Chem* **273**, 23698-23703.
- Smythe, C. und Cohen, P.** (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* **200**, 625-631.
- Snaith, S.M.** (1975). Characterization of jack-bean alpha-D-mannosidase as a zinc metalloenzyme. *Biochem J* **147**, 83-90.
- Spirig, U., Glavas, M., Bodmer, D., Reiss, G., Burda, P., Lippuner, V., te Heesen, S. und Aebi, M.** (1997). The STT3 protein is a component of the yeast oligosaccharyltransferase complex. *Mol Gen Genet* **256**, 628-637.
- Spiro, R.G.** (1969). Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens. *J Biol Chem* **244**, 602-612.
- Spiro, R.G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R.
- Spiro, R.G. und Bhoyroo, V.D.** (1980). Studies on the carbohydrate of collagens. Characterization of a glucuronic acid-mannose disaccharide unit from Nereis cuticle collagen. *J Biol Chem* **255**, 5347-5354.
- Stokes, D.L. und Wagenknecht, T.** (2000). Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* **267**, 5274-5279.
- Stolz, J. und Munro, S.** (2002). The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J Biol Chem* **277**, 44801-44808.
- Strahl-Bolsinger, S. und Tanner, W.** (1991). Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the dolichyl-phosphate-D-mannose-protein O-D-mannosyltransferase. *Eur J Biochem* **196**, 185-190.
- Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A.** (1999). Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* **274**, 9068-9075.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W.** (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 297-307.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. und Tanner, W.** (1993). PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8164-8168.
- Strahm, A., Amado, R. und Neukom, H.** (1981). Hydroxyproline-galactosides as protein-polysaccharide linkages in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Phytochem* **20**, 1061-1063.
- Tanner, W. und Lehle, L.** (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **906**, 81-99.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L. und Aebi, M.** (1992). The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity in vivo and in vitro. *EMBO J* **11**, 2071-2075.

- te Heesen, S., Knauer, R., Lehle, L. und Aebi, M. (1993). Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *EMBO J* **12**, 279-284.
- Thomas, B.J. und Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619-630.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J.F. (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 20837-20846.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K. und Ernst, J. (2000). Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**, 3063-3071.
- Totsuka, A. und Fukazawa, C. (1996). Functional analysis of Glu380 and Leu383 of soybean beta-amylase. A proposed action mechanism. *Eur J Biochem* **240**, 655-659.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. und Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Trueheart, J. und Fink, G.R. (1989). The yeast cell fusion protein FUS1 is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9916-9920.
- Ünligil, U.M. und Rini, J.M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 510-517.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. und Alberghina, L. (1991). Isolation and deduced amino acid sequence of the glycopospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J Biol Chem* **266**, 12242-12248.
- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. und Sentandreu, R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **148**, 88-94.
- Valls, L.A., Hunter, C.P., Rothman, J.H. und Stevens, T.H. (1987). Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* **48**, 887-897.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A. und Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**, 151-208.
- Varki, A. und Freeze, H.H. (1994). The major glycosylation pathways of mammalian membranes. A summary. *Subcell Biochem* **22**, 71-100.

- Vaughan, C.K., Buckle, A.M. und Fersht, A.R. (1999). Structural response to mutation at a protein-protein interface. *J Mol Biol* **286**, 1487-1506.
- Verger, A., Perdomo, J. und Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. *EMBO Rep* **4**, 137-142.
- von Figura, K. (1991). Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 642-646.
- Vrielink, A., Ruger, W., Driessen, H.P. und Freemont, P.S. (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J* **13**, 3413-3422.
- 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. und Aebi, M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**, 1790-1793.
- Wagner, A. (2001). Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eukaryotes. *Trends Genet* **17**, 237-239.
- Wang, Q., Graham, R.W., Trimbur, D., Warren, R.A.J. und Withers, S.G. (1994). Changing enzymatic reaction mechanisms by mutagenesis: conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme. *J Am Chem Soc* **116**, 11594-11595.
- Wang, X.H., Nakayama, K., Shimma, Y., Tanaka, A. und Jigami, Y. (1997). MNN6, a member of the KRE2/MNT1 family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 18117-18124.
- Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M. und Kinoshita, T. (2000). Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *EMBO J* **19**, 4402-4411.
- Watzel, M., Klis, F. und Tanner, W. (1988). Purification and characterization of the inducible  $\alpha$ -agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **7**, 1483-1488.
- Wiggins, C.A. und Munro, S. (1998). Activity of the yeast MNN1  $\alpha$ -1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7945-7950.
- Wilcox, C.A. und Fuller, R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J Cell Biol* **115**, 297-307.
- Willer, T. (2002). Protein O-Mannosylierung konserviert von der Hefe bis zum Menschen: Untersuchungen zur Bedeutung der Protein O-Mannosyltransferasen in der Spalthefe und in Säugern. *Dissertation, Regensburg*.
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S. (2002). Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* **12**, 771-783.

- Wilson, I.B.** (2002). Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 569-577.
- Wilson, V.G. und Rangasamy, D.** (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* **271**, 57-65.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W. und et al.** (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.
- Wolfe, K.H. und Shields, D.C.** (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713.
- Wrabl, J.O. und Grishin, N.V.** (2001). Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J Mol Biol* **314**, 365-374.
- Yamaguchi, N. und Fukuda, M.N.** (1995). Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *J Biol Chem* **270**, 12170-12176.
- Yan, Q. und 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 U S A* **99**, 15994-15999.
- Yan, Q. und Lennarz, W.J.** (2002b). Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. *J Biol Chem* **277**, 47692-47700.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yip, C.L., Welch, S.K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F.J., O'Hara, P.J. und MacKay, V.L.** (1994). Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2723-2727.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T. und Endo, T.** (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* **1**, 717-724.
- Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T. und Mikoshiba, K.** (1996). Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **271**, 18277-18284.
- Yuen, C.T., Chai, W., Loveless, R.W., Lawson, A.M., Margolis, R.U. und Feizi, T.** (1997). Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J Biol Chem* **272**, 8924-8931.

- Yuen, M.H., Mizuguchi, H., Lee, Y.H., Cook, P.F., Uyeda, K. und Hasemann, C.A.** (1999). Crystal structure of the H256A mutant of rat testis fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Fructose 6-phosphate in the active site leads to mechanisms for both mutant and wild type bisphosphatase activities. *J Biol Chem* **274**, 2176-2184.
- Zachara, N.E. und Hart, G.W.** (2002). The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* **102**, 431-438.
- Zechel, D.L. und Withers, S.G.** (2000). Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc Chem Res* **33**, 11-18.
- Zeller, T.M.** (1999). Charakterisierung funktioneller Domänen der Protein O-Mannosyltransferase 1 (Pmt1p) aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit, Regensburg*.
- Zeng, M.T., Gong, X.M., Evans, M.C., Nelson, N. und Carmeli, C.** (2002). Stabilization of iron-sulfur cluster F(X) by intra-subunit interactions unraveled by suppressor and second site-directed mutations in PsaB of Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1556**, 254-264.
- Zorzato, F., Menegazzi, P., Treves, S. und Ronjat, M.** (1996). Role of malignant hyperthermia domain in the regulation of Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**, 22759-22763.
- Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te Heesen, S., Lehle, L. und Aebi, M.** (1995). STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity in vivo. *EMBO J* **14**, 4949-4960.

## 7 EIGENE PUBLIKATIONEN

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. und Strahl-Bolsinger, S.** (2000). Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**, 19288-19296.

**Girrbach, V. und Strahl, S.** (2003). Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**, 12554-12562.



## ANHANG I

ScPmt1p	326	-DVGIGS-IISLRHLSTMG--GYLHSHSHNYPA-----GSEQQQSTLYPHMDANNDWL	PMT1-
CaPmt1p	342	-QVGLGS-VVTIRHVDQTG--GYLHSHSHNYPA-----GSKQQQITLYPHLDSNNKWL	Subfamilie
ScPmt5p	322	-EVAVGS-AVSLNHVGTAG--GYLHSHSHNYPA-----GSMQQQVTLYPHIDQNNKI	
ScPmt3p	334	-DVALGSSIIISIKNQALGG--ALLHSHVQPFPE-----GSEQQQVTVYGYSDANNEWF	PMT2-
ScPmt2p	341	-DIALGSSVVS IKNQALGG--SLHSHIQTYPD-----GSMQQQVTVYGYKDDANNEWF	Subfamilie
ScPmt6p	343	-DVAFGS-ELTIRSHGLSP--NLLHSHIQVYPE-----GSGGQROITGYGFADSNNVWK	
SpPmt3p	312	-DVAVGS-LVTIRNAIPEH--GYLHSHSELLYPE-----GTEQQQIISLVDEPNQNALWI	
ScPmt4p	332	KTNYNF-DIITIKHQDTD---AFLHSHLARYPQRYEDGRISAGQQQVTVGYTHPDENNQWE	PMT4-
SpPmt4p	337	TIINYY-DIVTIKHMGTN---AFLHSHPEKYPIPYDDGRISGGQQQVTVGYQFDDENNYWM	Subfamilie
rt	452	-AVVHGS-KSTLRHHTGR--TCWLHSHAAVYVRYPDGRGSSHQQQVTVGYSFKDNNVWL	
hPOMT1	398	-EVAFGS-QVTLRNVFQKPVPCWLLHSHQDTPYMIYENGSGSSHQQQVTVGYPFKDVNNWWI	

## Motiv A

L H S H Y P S Q Q Q V T Y D N N W

ScPmt1p	376	LELYNAPGESLTTFQ-----LTDGTVKRLHHTVTRCRLHSHDHKPPVSESSDWQKE
CaPmt1p	392	IEPYNG-TIHNETFVP-----LINGMKIRLKHINTGRRLHSHDEKPPVSESSDWQKE
ScPmt5p	372	IELAEHPNENVTSFQ-----LTDGTIIKLRQLKNGCRLHSHDHKPPVSONADWQKEV
ScPmt3p	385	FQIRGVPEPWTDAEN---KTIEFVKGGEMYRLMRLTGKLNHTEVPAPISKS---EYEV
ScPmt2p	392	FNRRERGLPSWSENE---TDIEYLPKPGTSYRLVHKSTGRNLHTEVVAAPVSKT---QWEV
ScPmt6p	393	FEFSRSSGLELDQNGTLNGKIIPITDGEVRLSHKNTGSNLHSHDVPSPHVSRG---NYEV
SpPmt3p	362	IEHEHSQDNNRSNIEL-----LKDGSVVRLRHVMTGRALHSHDHKPIVSNNDWQLEA
ScPmt4p	389	VLPHPGSD---VGKGQA-----VLLNQHIRLRHVATDTYLLAHDVASPFYPT---NEEI
SpPmt4p	394	ILPADHYDPPIEAKLNVP---VKNDYIKLHVGVTNTDLMTHDVASPYHPT---NEEF
rt	509	VKRPTKRT-WWWGDEPDI---IRHGEIICQLVHGITSRALNSHDVAAMTPQ---CQEV
hPOMT1	456	VKDPRRHQ-LVVSSPPRP---VRHCDMVQLVHGMTTRSLNTHDVAAAPLSPH---SQEV

## Motiv B

L H T L H<sub>g</sub> p s E

ScPmt1p	429	SCYGYSGFDGANDDWVVEIDKNSAP----GVAQERVIALDTEKFRIRHMTGCIYFSH
CaPmt1p	443	SCYGYDGFAGDANDDWVVEIVNYSRQK----GEAQTFVKAINTEFRIRHMTGHYLFSS
ScPmt5p	425	SCYGYEGFEGDINDDWIIEIDKRSEP----GPAQEHTRAIEKFRIRKYLTCGYLFSS
ScPmt3p	439	SAYGQDV-DLGDYKDNWIEIIVEQV-----GEEDPTLHPLSTSFRIKNSILGCYLAQS
ScPmt2p	445	SGYGDN-VVGDNKNWVIEIMDQR-----GDEDPEKHTLTTSFRIKNLEMGCYLAQT
ScPmt6p	450	SGYGSQ-SVGDLEKDNWIVETVKQMDSPNPVYSNENSTIHPVSTFRIKRVLCGYLAST
SpPmt3p	414	SAYGFGFEGDANDLFRIQILEKKSK----HATSNGTWETLNKFRIRHVFANCBLMSS
ScPmt4p	437	TTVTLEEGDGLYPETLFAFQPLKK-----SDEGHVLSKSTVSFRIRHVDTSVALWTH
SpPmt4p	446	TTVSVDDESACKKHEYLTFQVMSDN-----TDPQRPYTKASSFKLIRKLTHVAMWSD
rt	560	SCYIDYEIKWPVNCCARGDSER-----FRSDIWHAKSKVRLHVFVSTEASTKFS
hPOMT1	508	SCYIDYNISMPAQNLRLEIVNRG-----SDTDVWKTILSEVRFVHVTNSAVLKLS

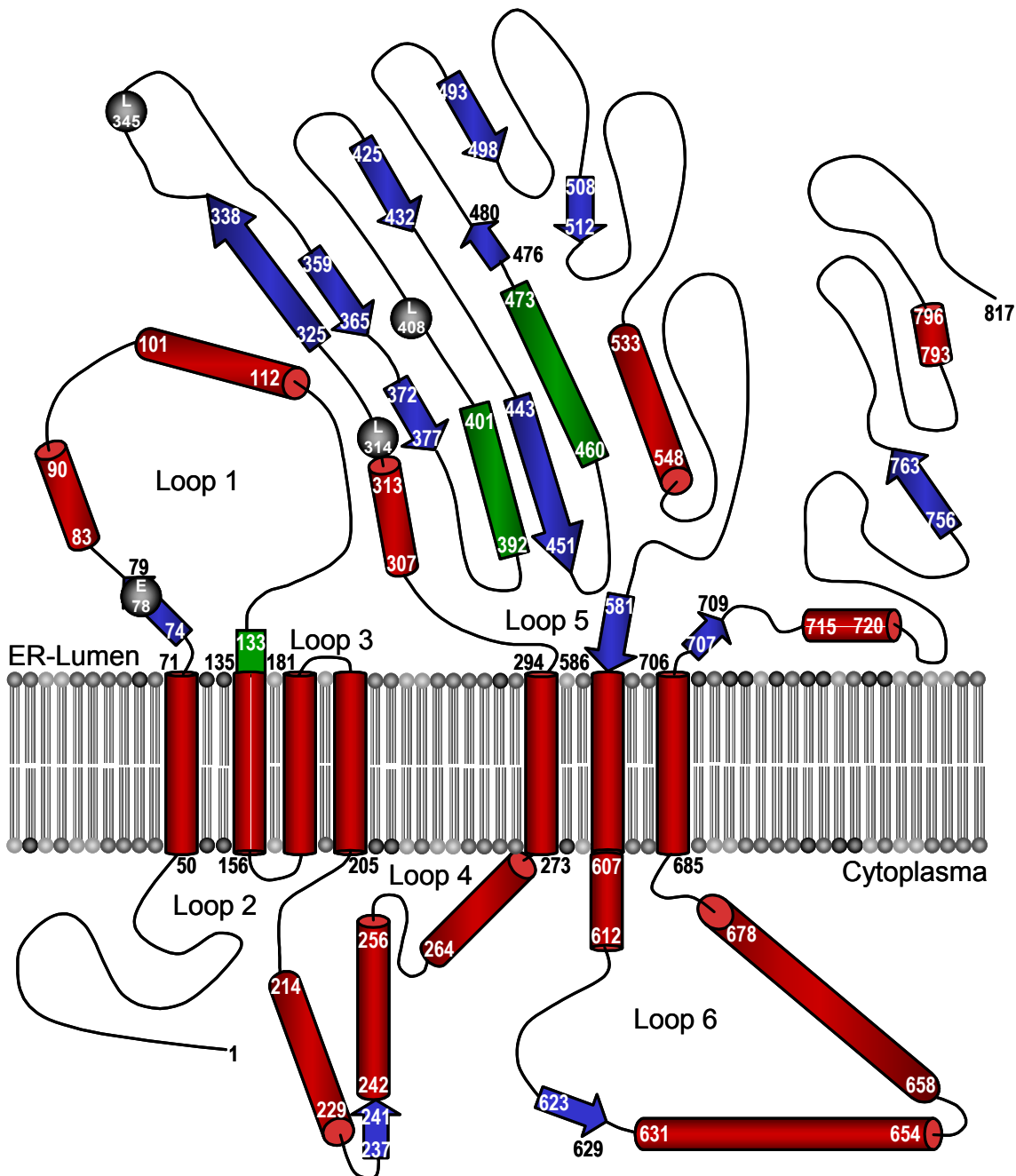
ScPmt1p	484	-EVKLPAWGFEGQCEVTCASSG--RHDLTLWYVENNSNPLLPEDTKRISYKPAS-----
CaPmt1p	498	-EVKLPEWGFEGQCEVTSASQG--KRALTHWYETNENSILPPSEAKIINYPKLS-----
ScPmt5p	480	-PEKLPEWGFEGQCEVTCAYFA--REDLTSWYTEENENEISLPNPEKVSYKMS-----
ScPmt3p	491	-GKHLPEWGFEGQCEVCLKHASKRDKRTWNNIETHENERLP-QGEDFVYPKTS-----
ScPmt2p	497	-GNSLPEWGFEGQCEVCMKNPFKRDKRTWNNIETHENERLPPRPEDFQYPKTN-----
ScPmt6p	509	-GLTYPAWGFEGQCEVCKDSWSRRDKSTWNNVBDHWNHNLE-TAEDYVPPKSN-----
SpPmt3p	469	-HRRFPDWGCDYQREVTCCRN--CVERSTWTFIESNYHDGLPSDSRKITYRKPG-----
ScPmt4p	490	NDELTPDWGFEGQCEVNGNKK--VIDPSNNWVDEIVNLDEVKVIYIPKVVKPLPF-----
SpPmt4p	499	-PKELPDWGFEGQCEVNGAKN--IQTGSIFWTFDDIIGLKDSRLKKEKKIPKKLPF-----
rt	610	-GRQLPEWGFEGQCEVNVADRE-KAIHKDAIWNVEEHAHRLRNHREREPQMLTAEMIPTKRT
hPOMT1	559	-GAHLPDWGFEGQCEVNGEKLGRGYHGSVWNVVEEHRYGASQEQRERERELHSPAQVDVSRN

## Motiv C

p<sub>e</sub>WGF Q E<sub>i</sub> t w<sub>i</sub> E

**Anhang I: Vergleich der Aminosäuresequenz (Loop 5) verschiedener Pmtps.** Die offenen Leserahmen von *S. cerevisiae* (Sc), *C. albicans* (Ca), *S. pombe* (Sp), *Drosophila* (rt, rotated abdomen) und humanen (hPOMT1) Pmtps sind angezeigt. Die Loop 5 Domäne von ScPmt1p (Asp326 – Ser532) wurde mit den Loop 5 Domänen der oben gezeigten Pmtps verglichen. Stark konservierte Aminosäuren (> 90 %) sind schwarz, weniger stark konservierte (> 50 %) sind grau hinterlegt.

## ANHANG II



**Anhang II: "JPRED" Sekundärstruktur-Vorhersage für Pmt1p.** Die einzelnen Pmt1p Domänen (Loop 1 – Loop 6 und C-Terminus) wurden mit den jeweiligen Domänen der Mannosyltransferasen aus der Bäckerhefe (Pmt2-6p) verglichen. Das Vorhersageprogramm für Sekundärstruktur "JPRED" berechnet darauf basierend, mit einem neuronalen Netzwerk, das als Jnet bezeichnet wird, die wahrscheinliche Sekundärstruktur für die Enzyme.  $\alpha$ -Helices sind rot und  $\beta$ -Faltblätter blau dargestellt. Bereiche, die sowohl eine Wahrscheinlichkeit für  $\alpha$ -Helices als auch für  $\beta$ -Faltblätter aufweisen, sind grün markiert. Die relative Lage der für die Pmt1p Mannosyltransferase-Aktivität essentiellen Aminosäuren sind in grauen Kugeln dargestellt.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit tatkräftig unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sabine Strahl für ihr stetes Interesse, hilfreiche Diskussionen und ihre intensive Unterstützung während meiner Doktorandenzeit. Selbst in stressigen Momenten und bei arbeitstechnischen Problemen nahm sie sich immer Zeit, um mir mit fachlichem Rat weiterzuhelfen. Außerdem hat es mich sehr gefreut, dass sie mir die Möglichkeit eröffnete, an verschiedenen interessanten Tagungen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. W. Tanner danke ich für die hilfreichen "Freitagsdiskussionen", sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine Anregungen zur Lösung von Problemen. In sehr guter Erinnerung werde ich auch die zahlreichen Ausflüge, Feste, den "Zwieselsteiner Hüttenzauber" und die Weihnachtsfeiern behalten, die Herr Tanner ermöglicht hat.

Susanne Lukas, Meike Priesmeier-Gradl, Christiane Endres und Annemarie Taffner gilt besonderer Dank für den engagierten Einsatz ihrer Arbeitskraft bei diversen Projekten und ihre hilfreiche Unterstützung im Laboralltag.

Den Mitgliedern der "Hefelabor-Außenstelle", die da wären Mark Lommel, Felix Hartlepp, Susanne Lukas, Lisa Borkner und Ronald Gerstl, danke ich für viele vergnügliche Arbeitsstunden, das extrem gute Arbeitsklima und die kleinen Aufmunterungen (Motivase) in Form von Haribo-Schnecken und sonstigem Süßzeug!

Margit Ecker, Ingrid Fuchs, Ilja Hagen, Julia Neugebauer, Ulrike Schermer, Sergej Sestak und Tobias Willer möchte ich sehr herzlich für die Tipps und Kniffe, sowie die anregenden Diskussionen danken. Des weiteren sorgten die außeruniversitären Projekte wie Bier brauen, Grillfeste, Kneipentouren etc. für ein außerordentlich angenehmes Arbeitsklima, das ich sehr genossen habe.

Den Praktikanten, Lisa Borkner, Ronald Gerstl, Felix Hartlepp, Christian Schütz, Ulrike Jahn, Astrid Munkert, Daniela Näther und Maria Schmid, möchte ich für ihr großes Engagement im Labor danken. Viele Ergebnisse dieser Arbeit sind durch ihren Einsatz zustande gekommen.

Für die hilfreichen Kommentare bezüglich dieses Skripts danke ich Ilja Hagen, Markus Hofmann, Mark Lommel und Tobias Willer.

Jürgen Stolz danke ich für diverse Hefe- und *E. coli*-Stämme sowie für Plasmide. Außerdem schulde ich ihm Dank für zahlreiche praktische Tipps und die Hilfe beim Pflanzenphysiologie-Praktikum. Herrn Ludwig Lehle sei ebenfalls für Hefestämme und mehrere polyklonale Antikörper gedankt.

Besonderer Dank gilt Vroni Mrosek, die mir bei organisatorischen Problemen immer eine große Hilfe war.

Markus möchte ich für die immerwährende Unterstützung, in guten wie in schlechten Zeiten, danken. Die von ihm organisierten Berg- und Skitouren waren stets eine willkommene Abwechslung zum Uni-Alltag und eine Möglichkeit neue Kraft für stressige Momente zu schöpfen.