

Biosynthese von Dolicholpyrophosphat-Chitobiose in *Saccharomyces cerevisiae*:

Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Alg13 und Alg14
als Untereinheiten eines neuartigen, dimeren
Glykosyltransferase-Komplexes

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

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und vorklinische Medizin
der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Tanja Bickel
aus Muhr am See
Regensburg 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 11.07.2007

Tag des Kolloquiums: 20.09.2007

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

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wirth

Erstgutachter: Prof. Dr. L. Lehle

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Sterner

Drittprüfer: Prof. Dr. H. Tschochner

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Proteinmodifikationen mit Kohlenhydratresten	2
1.1.1 Vorkommen und Funktion O-glykosidisch gebundener Zucker	2
1.1.2 Vorkommen und Funktion N-glykosidisch gebundener Zucker.....	4
1.2 Protein-N-Glykosylierung	5
1.2.1 Assemblierung des lipidgebunden Oligosaccharids.....	5
1.2.2 Übertragung der Zuckerstruktur durch den OST-Komplex	7
1.2.3 ERAD (<i>ER associated degradation</i>) im Zusammenhang mit der Oligosaccharidstruktur GlcNAc ₂ Man ₉ Glc ₃	7
1.3 Proteinglykosylierung bei pathogenen Organismen	8
1.4 Glycosyltransferasen als Membranproteine	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2. ERGEBNISSE	12
2.1 In silico Identifizierung der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gene YGL047W und YBR070C als potentielle N-Acetylglukosamintransferase.	12
2.2 Die Reprimierung von <i>ALG13</i> und <i>ALG14</i> hat <i>in vivo</i> einen Defekt in der Protein-N-Glykosylierung und die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc ₁ zur Folge	16
2.3 Alg13p und Alg14p katalysieren die Bildung von Dol-PP-GlcNAc ₂ <i>in vitro</i>	19
2.4 Alg14p rekrutiert Alg13p an die ER Membran.....	22
2.5 Das Fusionskonstrukt aus <i>ALG14</i> und <i>ALG13</i> bildet ein aktives Enzym	25
2.6 Untersuchungen von Alg13p in Bezug auf die GNT Aktivität und Interaktion mit Alg14p...30	30
2.6.1 Die cytosolische Fraktion von Alg13p	30
2.6.2 Untersuchung der UDP-GlcNAc Bindungsstellen im Alg13 Protein.....	34
2.6.3 Homologe Alg13 Proteine aus anderen Organismen	37
2.7 Topologie und essentielle Aminosäuren von Alg14p	40
2.7.1 Alg14p ist ein Membranprotein mit einer Transmembranspanne	40
2.7.2 Der C-Terminus von Alg14p ist essentiell für die Glukosamintransferaseaktivität	45
2.7.2.1 Zielgerichtete Mutagenese von Alg14p	46
2.7.2.2 Herstellung und funktionelle Analyse einer <i>ALG14</i> Genbank	47
2.8 Ein Protein aus <i>Leishmania major</i> katalysiert in <i>S. cerevisiae</i> die Bildung von Dol-PP-GlcNAc ₂	51

3. DISKUSSION	56
3.1 Das Dimer Alg13p/Alg14p katalysiert die Bildung von Dol-PP-GlcNAc ₂	56
3.2 Die Beteiligung von Alg13p an der Substratbindung.....	58
3.3 Analyse der Membrantopologie und essentieller Aminosäuren von <i>ALG14</i>	61
3.3 Homologe Proteine zu Alg13p/Alg14p aus anderen eukaryotischen Organismen.....	64
4. ZUSAMMENFASSUNG	67
5. MATERIAL	69
6. METHODEN.....	79
6.1. Anzuchtbedingungen und Medien	79
6.1.1 Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i>	79
6.1.2 Anzuchtbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	79
6.2. Molekularbiologische Methoden.....	81
6.2.1 Klonierungstechniken und Restriktionsanalysen	81
6.2.2 PCR Reaktionen	81
6.2.3 Subklonierung in pBS.....	81
6.2.4 Zielgerichtete Mutagenese.....	82
6.2.5 PCR-generierte Zufallsmutagenese.....	82
6.2.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	84
6.2.7 Transformation von <i>E.coli</i>	84
6.2.8 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	84
6.2.9 Hefetransformation	85
6.2.10 Isolierung genomischer DNA aus Hefe	85
6.2.11 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	86
6.2.12 Herstellung Uracil heterotropher Hefestämme nach Fred Winston	86
6.2.13 N-terminale Epitopmarkierung von Proteinen auf genomischer Ebene	86
6.2.14 Integration eines Galaktose regulierbaren Promotors in das Hefegenom	87
6.2.15 Generierung eines Fusionskonstruktes von <i>ALG14</i> mit <i>SUC2</i> und <i>HIS4</i>	88
6.3 Biochemische Methoden	89
6.3.1 Isolierung von Rohmembranen.....	89
6.3.2 Membranisolierung im kleinen Maßstab	89
6.3.3 Alkalische Lyse von Hefezellen	90
6.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	90
6.3.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und <i>Western Blot</i> Analyse	90

6.3.6 Western „Stripping“	92
6.3.7 <i>In vivo</i> Lipidoligosaccharid-Markierung mit [³ H]Glukosamin	92
6.3.8 <i>In vivo</i> Lipidoligosaccharid-Markierung mit [³ H]Mannose.....	92
6.3.9 Dol-PP-GlcNAc ₁ Substratsynthese.....	93
6.3.10 <i>In vitro</i> Glukosamintransferasetest (GNT Test).....	94
6.3.11 O-GlcNAc Transferasetest.....	95
6.3.12 Immunpräzipitation von Alg13p ^{ZZ}	95
6.3.13 Reinigung von in <i>E. coli</i> heterolog exprimiertem Alg13p ^{His}	96
ANHANG I DAS TET-PROMOTOR SYSTEM	98
ANHANG II VERWENDETE DATENBANKEN	99
LITERATURVERZEICHNS	100

Abkürzungen

ALG	Asparagine <u>linked</u> Glycosylation
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BA	Benzamidin
C/M/H	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O, vol/vol/vol
Ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CPY	Carboxypeptidase Y
DHPC	Diheptanoyl-Phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dol-PP	Dolicholpyrophosphat
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
Glc	Glukose
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunden
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LLO	lipid-linked oligosaccharide
Man	D-Mannose
min	Minuten
NP40	Nonidet-P40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
ORF	open reading frame
OST	N-Oligosaccharyltransferase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween 20
UDP	Uridindiphosphat
U	Units, Einheit für enzymatische Aktivität
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Als Ende der 1990er Jahre die ersten Genome von Organismen wie *E. coli* und *S. cerevisiae* entschlüsselt wurden, war dies ein Meilenstein für die moderne Molekularbiologie und die Voraussetzung für die heutige Bioinformatik. In den letzten Jahren macht die Technologie der Nukleinsäureanalytik immer größere Fortschritte, und mittlerweile ist die Sequenzierung des Genoms eines ganzen Organismus kein großes Unterfangen mehr. Es wurden sogar Methoden entwickelt, mit denen ein Organismus in wenigen Tagen sequenziert werden kann, wobei für 25 Millionen Basen nur vier Stunden benötigt werden [1, 2]. Daraus ergibt sich eine Flut von Nukleotidsequenzen und abgeleiteten Proteinen, deren genaue Rolle im großen Zusammenspiel innerhalb der Zelle jedoch weiter unbekannt bleibt. In der Aufklärung der Funktion und Interaktion der Proteine liegt nun die große Aufgabe. Als im Jahr 2000 nach 10-jähriger Arbeit das komplette menschliche Genom entschlüsselt wurde, waren viele Wissenschaftler überrascht von der geringen Anzahl der potentiellen Proteine, die sich aus der Nukleotidsequenz ergaben. Daraus folgt, dass sich die Komplexität eines Organismus nicht nur durch die Anzahl der Gene, sondern auch durch die Organisation und Vernetzung der daraus resultierenden Proteine erschließt.

Die Funktion von Proteinen ist darüber hinaus nicht nur durch ihre Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden dreidimensionalen Struktur charakterisiert, sondern auch durch zahlreiche co- und posttranskriptionale Modifikationen, die sowohl die Enzymaktivität, Stabilität als auch die zelluläre Lokalisation des Proteins beeinflussen können. Beispiele für diese Proteinmodifikationen sind Phosphorylierungen (vor allem bei Kinasen, die auf diese Weise reguliert werden), Acetylierungen (z. B. bei Histon), Ubiquitynylierung (von Proteinen die degradiert werden sollen) und die Anheftung von verschiedensten Zuckerstrukturen in Kompartimenten des sekretorischen Wegs, die Proteinglykosylierung.

1.1 Proteinmodifikationen mit Kohlenhydratresten

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine äußerst komplexe Modifikation, bei der Kohlenhydratreste kovalent an Proteine gebunden werden. Die dabei entstehenden Glykoproteine erfüllen vielfältige Funktionen in und außerhalb der Zelle und fungieren beispielsweise als Strukturproteine, Hormone oder Rezeptorproteine. Eine Modifizierung von Proteinen mit Zuckern spielt auch bei der Sortierung von löslichen Proteinen innerhalb der Zelle eine Rolle. Seit langem ist bekannt, dass in vielzelligen Organismen Proteine, die ins Lysosom transportiert werden sollen, mit Mannose-6-Phosphat modifiziert werden [3, 4].

Es gibt sowohl *N*-glykosidisch (über Asparagin) als auch *O*-glykosidisch (über Serin, Threonin) an das Protein gebundene Saccharide. Beispielsweise besteht etwa die Hälfte des Trockengewichts der Zellwand der Bäckerhefe aus Glykoproteinen, die sowohl *N*- als auch *O*-glykosidisch gebundene Zuckerketten tragen [5]. Der Kohlenhydratanteil des Proteins kann zwischen 1 % und 90 % des Gesamtgewichts variieren und ist damit eine sehr heterogene Modifikation.

1.1.1 Vorkommen und Funktion *O*-glykosidisch gebundener Zucker

Die *O*-glykosidisch an Proteine gebundenen Zuckerstrukturen sind sowohl hinsichtlich ihrer Bindungsart als auch der Kettenlänge und Zucker äußerst heterogen [6]. In tierischen Zellen treten am häufigsten *O*-Glykane des so genannten Mucin-Typ auf. Die Benennung beruht auf der Tatsache, dass Saccharide dieser Struktur häufig bei Mucinen beobachtet werden. Mucine sind Glykoproteine mit hohem Kohlehydratanteil, die auf der Zelloberfläche und in Körpersekreten vorkommen [7]. Diese Modifikation beginnt im Golgi Apparat, wo im initialen Schritt Serin oder Threonin über eine α -glykosidische Bindung mit einem N-Acetylgalaktosaminrest modifiziert wird [8, 9]. Die weitere Verlängerung dieses initialen GalNAc Restes kann sowohl durch GlcNAc als auch GalNAc erfolgen. Auch die Bindungen der einzelnen Zucker liegen auf verschiedenste Weise (α , β , 1-3, 1-6) vor, so dass insgesamt 8 unterschiedliche Core-Strukturen charakterisiert wurden.

Bei der *O*-Mannosylierung handelt es sich um eine weitere essentielle Proteinmodifikation, die im endoplasmatischen Retikulum mit der Übertragung der initialen Mannose von DolP-Man auf Serin- oder Threoninreste beginnt [10]. Diese Modifikation wurde anfangs nur für Pilze beschrieben, aber in den letzten Jahren konnten *O*-mannosyierte Proteine auch in Höheren Eukaryoten gefunden werden [11, 12]. In der Bäckerhefe erfolgt die Verlängerung des initialen Mannoserests mit weiteren 1-4 Mannosen durch GDP-Man im Golgi Apparat. In Säugerzellen

werden im Golgi Apparat statt Mannose andere Zucker, wie N-Acetylglukosamin, Galaktose oder Sialinsäure, verwendet [13].

Die vorrangige Bedeutung der *O*-Mannosylierung bei *S. cerevisiae* liegt in der Gewährleistung der Zellwandstabilität [11]. Bei mehrfacher Disruption von Genen, die an der *O*-Mannosylierung beteiligt sind (**P**rotein *O*-Mannosyltransferase – PMT Familie), kann das Wachstum von Hefezellen nur auf osmotisch stabilisiertem Medium beobachtet werden [14]. Beim Menschen liegt die Bedeutung dieser Modifikation unter anderem in der Gewährleistung der embryonalen Muskelentwicklung [15]. Defekte äußern sich in Anomalien wie dem *Walker-Warburg* Syndrom und der *muscle-eye-brain* Krankheit [16, 17].

Als Sonderfall der *O*-Glykosylierung gilt die im Cytoplasma erfolgende Anheftung eines N-Acetylglukosaminrests an Serin- oder Threoninresten von cytoplasmatischen oder nukleären Proteinen durch die *O*-GlcNAc Transferase (OGT). Im Gegensatz zu den anderen Glykosylierungen (*O*-Mannosylierung, *N*-Glykosylierung) handelt es sich hierbei um eine sehr dynamische Modifikation, vergleichbar mit der Proteinphosphorylierung, die derzeit ausschließlich bei Höheren Eukaryoten beschrieben wurde [18]. Für einige Proteine konnte gezeigt werden, dass die gleiche Aminosäure alternativ sowohl phosphoryliert, als auch durch O-GlcNAc modifiziert wird. Es wurden aber auch Fälle beschrieben, in denen die Glykosylierung eine Phosphorylierung an einer benachbarten Aminosäure verhindern kann [19]. Dies führte zu der Vermutung, dass die Bedeutung dieser Modifikation in der Modulierung der Proteinfunktion liegt [18]. Charakteristisch für die *O*-GlcNAc Transferase ist eine N-terminale Proteinstruktur, durch die ein weites Spektrum von Zielproteinen erkannt werden kann [20].

Die *O*-GlcNAc Modifikation spielt bei einigen humanen Krankheiten eine Rolle. Ein Beispiel ist die Alzheimer Erkrankung und das daran beteiligte microtubuli-assoziierte Protein Tau, das im gesunden Menschen *O*-GlcNAc modifiziert ist, wohingegen im Patienten Hyperphosphorylierung auftritt [21, 22]. Der genaue Mechanismus, der entweder eine Phosphorylierung oder eine *O*-GlcNAc Modifikation bewirkt, ist allerdings noch unklar. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass ein Protein durch unterschiedliche Modifikationen andere Eigenschaften haben kann, die zu einem ausgeprägten Krankheitsbild wie der Alzheimer Erkrankung führen können.

Im Organismus *Trypanosoma cruzi* wurde eine bislang einzigartige posttranskriptionale Modifikation von Zelloberflächenproteinen beschrieben, die ebenfalls *O*-glykosidisch gebundene α -N-Acetylglukosaminreste aufweist [23]. Die Enzymaktivität dieser *O*- α -GlcNAc Transferase (MUC) wird jedoch nicht im Cytoplasma, wie bei der OGT, sondern in Mikrosomen gefunden. Auch das modifizierte Peptid unterscheidet sich von dem der OGT. Hierbei handelt es sich also um eine membrangebundene *O*-GlcNAc Transferase, deren Zielproteine sich von denen der cytoplasmatischen OGT unterscheiden.

1.1.2 Vorkommen und Funktion N-glykosidisch gebundener Zucker

Werden Kohlenhydratreste kovalent an Asparagin-Seitenketten gebunden, spricht man von Protein-N-Glykosylierung. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird die Zuckerstruktur GlcNAc₂Man₉Glc₃ synthetisiert und co-translational an ausgesuchte Asparaginreste übertragen. Im Golgi Apparat erfolgt die weitere Prozessierung zu den terminalen und sehr unterschiedlichen Strukturen. Die N-Glykosylierungsmaschinerie ist innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert, tritt allerdings in leicht modifizierter Form auch bei Archaeen und gramnegativen Bakterien (*Campylobacter jejuni*) auf [24-27]. N-glykosilierte Proteine sind bei Archaeen maßgeblich an der Ausbildung der Zellwandstruktur beteiligt. In Eukaryoten konnten mit Hilfe von Hefemutanten Gene identifiziert werden, die an der N-Glykosylierung beteiligt und für die Hefe essentiell sind [28, 29]. Im weiteren Verlauf wurden auch für Höhere Eukaryoten die entsprechenden Enzyme identifiziert und charakterisiert, die zum Teil auch hier wesentlich für die Lebensfähigkeit sind [30].

Der am häufigsten beobachtete Effekt bei defekter Protein-N-Glykosylierung in Eukaryoten ist die Akkumulation falsch oder ungefalteter Proteine und deren Aggregation. Dabei sind alle Varianten möglich: Von Proteinen, die in ihrer Faltung und Aktivität vollständig von der korrekten Glykosylierung abhängen, über Proteine bei denen nur in bestimmten Entwicklungsstadien oder Zelltypen die Zuckerstrukturen von Bedeutung sind, bis hin zu völlig vom Glykosylierungsstatus unabhängigen Proteinen [31-33]. Die Glykanstruktur beeinflusst den Faltungsprozess dahingehend, dass kompaktere Konformationen der Polypeptidkette bevorzugt werden [34, 35]. Im Falle der Invertase konnte ein positiver Effekt der Glykane auf die Faltung und die Löslichkeit des Proteins beobachtet werden [36, 37].

Ein äußerst interessantes Enzym ist die Hexosaminidase aus *Aspergillus oryzae* (hexA) [38]. Dieser Pilz besitzt für HexA eine einzigartige Präpropeptidstruktur. Das nicht abgespaltene Propeptid ist spezifisch für diesen Pilz und essentiell für die Enzymaktivität, Dimerisierung und Sekretion der Hexosaminidase. Sowohl das Propeptid als auch das Enzym werden durch Glykosylierungen modifiziert, jedoch auf unterschiedliche Weise. Während die O-glykosidisch gebundenen Glykane innerhalb des Propeptids für die volle Enzymaktivität essentiell sind, beeinflusst die N-Glykosylierung der katalytisch aktiven Domäne die Stabilität und Löslichkeit des Proteins. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll das komplexe Zusammenspiel verschiedener Proteinmodifikationen.

1.2 Protein-N-Glykosylierung

1.2.1 Assemblierung des lipidgebundenen Oligosaccharids

Die Aufklärung des schrittweisen Aufbaus des lipidgebundenen Oligosaccharids (LLO) begann in den 1980er Jahren durch die von Robbins und Mitarbeiter isolierten Hefemutanten, die einen Defekt in der Protein N-Glykosylierung zeigten [28, 29]. Bis jedoch alle einzelnen, am Aufbau der Zuckerstruktur beteiligten Enzyme gefunden und charakterisiert wurden, vergingen mehr als 20 Jahre (zusammengefasst in [39, 40]).

Eine schematische Darstellung des Aufbaus der lipidgebundenen Zuckerstruktur (LLO, *lipid linked oligosaccharide*) Dol-PP-GlcNAc₂Man₉G₃ ist in Abbildung 1 gegeben.

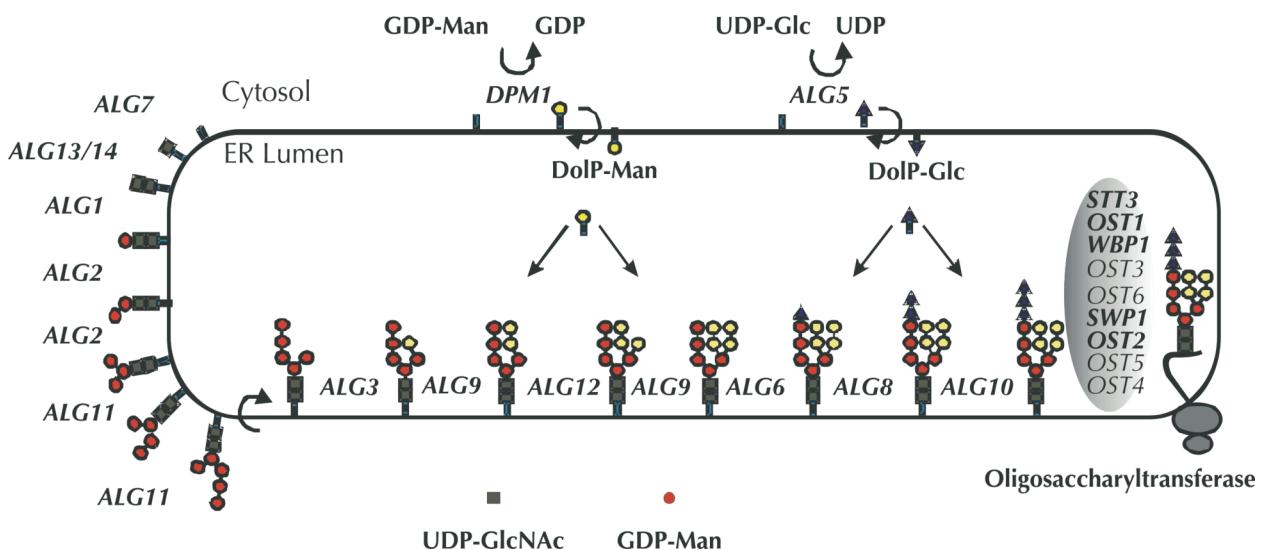


Abb.1: Assemblierung des lipidgebundenen Oligosaccharids Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Die fett gedruckten Unter-einheiten der OST sind essentiell.

Zunächst wird der Lipidanker Dolichol, bestehend aus 10 bis 13 Isopreneinheiten, unter Mitwirkung von Rer2p, einer cis-Prenyltransferase aufgebaut und mit Hilfe von Sec59p phosphoryliert [41, 42]. Die erste Reaktion des LLO Reaktionsweges besteht in der Anheftung eines Glukosaminphosphats von UDP-GlcNAc an Dolicholphosphat unter Bildung einer Pyrophosphatbindung zu Dol-PP-GlcNAc₁. Diese Reaktion wird von Alg7p (**a**sparagine **I**nked **g**lycosylation) katalysiert [43, 44].

Im nächsten Schritt wird durch eine neuartige N-Acetylglukosamintransferase ein zweiter GlcNAc-Rest übertragen. Die enzymatische Aktivität dieses Enzyms wurde bereits 1982 beschrieben [45], das Enzym und der Aufbau aus zwei Proteinen (Alg13/Alg14) wurde in dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert.

Die UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc Transferase (GNT) ist bislang die einzige bekannte Transferase des LLO Reaktionswegs, die aus zwei Komponenten, einer membrangebundenen (Alg14p) und einer löslichen (Alg13p) Untereinheit, besteht.

Alg1p katalysiert anschließend die Übertragung der ersten Mannose von GDP-Mannose auf die dolicholgebundene Chitobiose [46]. Die nächsten vier Mannosereste werden durch zwei Enzyme, Alg2p und Alg11p ebenfalls von GDP-Man übertragen [47]. Alle bisher geschilderten Reaktionen laufen auf der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums ab, die nachfolgenden jedoch auf der luminalen Seite. Dazu muss die hydrophile Zuckerstruktur mit Hilfe des Rft1 Proteins die Membran passieren [48]. Mutationen oder Deletionen von Genen, die an der Bildung von Dol-PP-GlcNAc₃Man₅ beteiligt sind, wirken sich gravierend aus. In der Hefe sind Deletionen dieser Gene letal, Mutationen beim Menschen führen zu mehr oder weniger stark ausgeprägter geistiger Retardierung und Dysmorphien, die verschiedene Organe betreffen und abhängig von der Restaktivität des jeweiligen Enzyms sind (CDG Syndrom, *congenital disorders of glycosylation*) [30, 40].

Die nachfolgenden Reaktionen finden im ER Lumen statt, wo nicht mehr Nukleotid-aktivierte Zucker, wie GDP-Man oder UDP-GlcNAc als Glykosyldonor fungieren, sondern lipidgebundene Zucker DolP-Man und DolP-Glc verwendet werden.

Deletionen der Gene Alg3p, Alg9p und Alg12p, durch die weitere vier Mannosereste übertragen werden, wirken sich in der Hefe nur moderat aus. *S. cerevisiae Δalg3* Mutanten zeigen *in vivo* eine Reduktion des Glykosylierungsstatus von Glykoproteinen wie z. B. der Carboxypeptidase Y (CPY). Einerseits werden kürzere Ketten mit nur fünf Mannoseresten übertragen, andererseits ist Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ für die Hefe-OST ein schlechteres Substrat als das Volllängen LLO Dol-PP-GlcNAc₂Man₅Glc₃, so dass manche Glykosylierungsstellen im Polypeptid unmodifiziert bleiben [45, 49, 50]. Alg9p katalysiert zwei α-1,2 Verknüpfungen und ist somit für die Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂Man₇ und Dol-PP-GlcNAc₂Man₉ nötig [51]. Für *Δalg12* Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Unterglykosylierung des Glykoproteins CPY nur marginal ist, jedoch falsch gefaltete CPY im ER akkumuliert [52].

Schließlich übertragen die Genprodukte *ALG6*, *ALG8* und *ALG10* drei Glukosereste auf das Oligosaccharid. Dadurch wird die Übertragungseffizienz des Oligosaccharids auf die Polypeptidkette durch die Oligosaccharyltransferase (OST) gesteigert [53-56].

1.2.2 Übertragung der Zuckerstruktur durch den OST-Komplex

Der zentrale Schritt der Protein-N-Glykosylierung ist die Anheftung des vorgefertigten Core-Oligosaccharids $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST-Komplex) an die Polypeptidkette. Es handelt sich hierbei um einen heterologen Multienzymkomplex, der aus insgesamt neun Untereinheiten besteht, von denen fünf Proteine in der Hefe essentiell sind [57, 58]. Das innerhalb der Eukaryoten hoch konservierte Protein Stt3p wird als die katalytisch aktive Untereinheit angesehen, auch wenn der letzte Beweis noch aussteht.

Das Oligosaccharid $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ wird über eine β -Glycosylamid Bindung an bestimmte Asparaginreste innerhalb des Sequons Asn–X–Ser/Thr gebunden, wobei Threonin eine höhere Glykosylierungseffizienz zeigt [59]. Die mittlere Aminosäure X kann jede beliebige sein außer Prolin. Weiterhin ist die lokale Umgebung des Sequons von Bedeutung. Der Abstand vom C-Terminus des Proteins spielt genauso eine Rolle wie der Abstand zu hydrophoben Bereichen [60]. Das Glykosylierungsmotiv Asn–X–Ser/Thr ist also unbedingt nötig, aber nicht die alleinige Determinante für diese Modifikation, da nur ca. 90 % der Asparaginreste innerhalb eines Sequons tatsächlich glykosyliert werden [59].

1.2.3 ERAD (*ER associated degradation*) im Zusammenhang mit der Oligosaccharidstruktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$

Die ER residenten Lektine mit Chaperonfunktion, Calnexin (membrangebunden) und Calreticulin (löslich), sind an der Faltung von Proteinen und der Assemblierung von Untereinheiten zum oligomeren Komplexen beteiligt [61, 62]. Weiter erlaubt die Interaktion von glykosylierten Polypeptiden mit diesen Proteinen die Rekrutierung des Co-Chaperons ERp57, einer Thiol-Oxidoreduktase, welche die Bildung von S-S Brücken katalysiert [62, 63].

Das Protein-gebundene Oligosaccharid spielt beim Abbau von falsch gefalteten Proteinen im ER die zentrale Rolle. Nachdem die Glukosidasen I und II die drei Glucosereste der Zuckerstruktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ entfernt haben, spaltet Mannosidase I eine Mannose, zur resultierenden Struktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ [64, 65]. Ein intaktes Glykoprotein mit diesem Oligosaccharid verlässt das ER und wird im Golgi-Apparat weiter modifiziert. Handelt es sich aber um ein falsch gefaltetes Protein oder um nicht assemblierte Untereinheiten wird das Oligosaccharid $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ durch die UGGT (Uridin 5'-diphosphat-Glukose: Glycoprotein Glukosyltransferase) zu $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8\text{Glc}_1$ reglukosyliert und in dieser Form wieder von Calnexin gebunden. Danach beginnt der Faltungsprozess von neuem [66-68]. Proteine, die abgebaut werden, verlassen das ER über das Translokton Sec61p, werden im Cytosol ubiquitinyliert und mit Hilfe des Proteasoms

abgebaut [64, 69, 70]. Ob das Protein seine aktive Konformation erreicht hat, wird vermutlich über die Exposition hydrophober Domänen überprüft.

1.3 Proteinglykosylierung bei pathogenen Organismen

Die Protein-N-Glykosylierung des gramnegativen Bakteriums *Campylobacter jejuni* wird seit einigen Jahren intensiv untersucht [71, 72]. *C. jejuni* gehört zu der Gruppe der Zoonoseerreger, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Durch Mutationen im für die N-Glykosylierung verantwortlichen Gen-Cluster konnte gezeigt werden, dass der Glykosylrest hoch immunogen ist und eine Rolle in der Proteinkomplex-Assemblierung spielt [26]. Die Struktur des Glykans in *C. jejuni* unterscheidet sich sehr von der wie sie in Eukaryoten vorkommt. Sie wurde mit Hilfe von MS und nano NMR aufgeklärt und enthält einen speziellen Bestandteil, das Bacilosamin, das anstelle von N-Acetylglukosamin genutzt wird [73].

Eine wichtige Gemeinsamkeit zwischen den eu- und prokaryotischen Systemen jedoch ist die Verknüpfung des Zuckers mit einem Asparaginrest im Polypeptid und das Sequonmotiv Asn–X–Ser/Thr [74]. Allerdings spielt hier auch eine saure Aminosäure an Position -2 eine wichtige Rolle, wodurch die Übertragungseffizienz gesteigert wird [75]. Wie im eukaryotischen System scheint auch hier das Tripeptid für die Glykosylierung nötig, aber nicht die alleinige Determinante zu sein. Ebenso wie in Eukaryoten wird Prolin als mittlere Aminosäure nicht akzeptiert.

In dieser Arbeit wurde ein offener Leseraum aus dem Trypanosom *Leishmania major* identifiziert, weshalb die N-Glykosylierung dieser Gattung hier kurz erläutert wird. Leishmanien sind geißeltragende Protozoen, die als intrazelluläre Parasiten mit einem Wirtswechsel zwischen Stechmücken (Sanfliegen) und Wirbeltieren leben. Während bei Bakterien ein Undecaprenylpyrophosphat als Membrananker für die Synthese des Oligosaccharids dient, verwenden Leishmanien, wie andere Eukaryoten, Dolicholphosphat. Den übertragenen Oligosacchariden fehlen die für Eukaryoten typischen Glukosereste, so dass die letztlich übertragene Struktur speziesabhängig $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{6-9}$ ist.

Die Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle sind äußerst komplex und zum großen Teil noch nicht verstanden. Gesichert ist jedoch zum derzeitigen Zeitpunkt, dass die Glykoproteine bei der Invasion der Erreger in die Makrophagen eine Rolle spielen. Eine zweite Bedeutung der Glykanstrukturen ist die Bindung der Leishmanien an das Darmepithel der Sandfliege, die über Lektinrezeptoren erfolgt.

1.4 Glykosyltransferasen als Membranproteine

Membranproteine nehmen eine Vielzahl verschiedener Aufgaben innerhalb der Zelle wahr. Während cytosolische Proteine meist in monomerer Form vorliegen, existieren viele der bislang untersuchten Membranproteine in Form von homo- oder heterooligomeren Komplexen. Dabei sind spezifische Protein-Protein Interaktionen an der Oligomerisierung beteiligt. Das beste Beispiel für einen heterooligomeren Komplex im Zusammenhang mit der *N*-Glykosylierung ist sicherlich der Oligosaccharyltransferase-Komplex aus Hefe, der aus neun Untereinheiten besteht, von denen fünf für die Enzymaktivität und das Wachstum essentiell sind [57, 58]. Weiter gibt es Hinweise, dass die ER residenten Mannosyl- und Glukosyltransferasen, die am Aufbau des LLO beteiligt sind, in Komplexen vorliegen [dieses Labor, Diplomarbeit Tanja Bickel, Andrea Müller].

Die Mehrzahl der Glykosyltransferasen in Eukaryoten sind Membranproteine, die im ER Lumen oder im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Nicht membranständige Glykosyltransferasen sind z. B. beim Menschen im Blut und anderen Körperflüssigkeiten zu finden und werden aus einer membrangebundenen Form durch proteolytische Spaltung der katalytischen Domäne freigesetzt [76]. Allgemein katalysieren Glycosyltransferasen den Transfer von aktivierten Zuckern auf ein Akzeptormolekül. Dabei kann es sich um eine wachsende Oligosaccharidkette, ein Protein oder um Lipide handeln [77]. Aufgrund ihrer Donor- und Akzeptorspezifität sowie Sequenzhomologien werden diese Transferasen in insgesamt 84 Familien eingeteilt, die in der CAZY-Datenbank (Carbohydrate-active Enzymes) hinterlegt sind [78, 79]. Trotz der zahlreichen Unterschiede hinsichtlich der Proteinsequenz und Substratspezifität, können die bisher untersuchten Glykosyltransferasen hinsichtlich der Struktur erstaunlicherweise in nur zwei Superfamilien differenziert werden (**Glycosyltransferase; GT-A und GT-B**, Abb. 2) [80, 81].

Die GT-A Superfamilie zeichnet sich zum einen durch ein Sequenzmotiv – DXD – und zum anderen durch die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen (Mn^{2+} , Mg^{2+}) aus. Es wird in der Literatur postuliert, dass dieses Sequenzmotiv die Bindung von zweiwertigen Kationen vermittelt und direkt an der Katalyse beteiligt ist.

Die Struktur ist gekennzeichnet durch parallele β -Faltblätter, die an beiden Seiten von α Helices flankiert werden (Abb. 2). Dabei befindet sich die Zuckernukleotidbinderegion im N-terminalen Bereich, die Akzeptorbindestelle in der C-terminalen Domäne des Proteins [80]. In einigen Fällen lassen sich Glykosyltransferasen dieser Superfamilie in drei räumliche Abschnitte unterteilen. Eine kurze N-terminale cytoplasmatische Domäne, gefolgt von einer Transmembranspanne und eine große globuläre katalytische Domäne, die außerhalb der Membran liegt [82, 83].

Die Mitglieder der Superfamilie GT-B besitzen eine Zwei-Domänen Struktur, die durch eine tiefe Spalte getrennt sind (Abb. 2). Es wird postuliert, dass das Sequenzmotiv GXGGX die Bildung des so genannten *Rossmann Fold* induziert, der wiederum eine typische Nukleotidbindedomäne bildet [84]. Oft sind die Mitglieder der GT-B Superfamilie membranassoziiert, seltener Transmembranproteine [83, 85].

Für die Glykosyltransferasen MurG und OtsA konnte gezeigt werden, dass ein Prolin- und glycinreiches Motiv im C-Terminus entscheidend an der Bindung des Zuckerdonors beteiligt ist [86, 87].

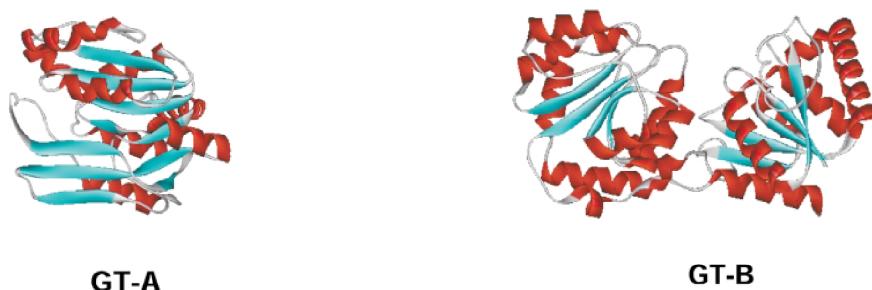


Abbildung 2: Strukturvorschläge von Glykosyltransferasen der GT-A und GT-B Superfamilie. Aus Pedro M. Coutinho und Bernard Henrissat J. Mol. Biol. (2003) 328, 307–317 [79]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit waren noch nicht alle an der LLO Assemblierung beteiligten Glykosyltransferasen molekular bekannt und biochemisch charakterisiert. Durch Untersuchungen der Mannosyltransferasen (Alg3p, Alg9p und Alg12p) gab es Hinweise, dass diese Enzyme heterologe Enzymkomplexe bilden (dieses Labor, Diplomarbeit Tanja Bickel). Unter der Annahme, dass dies auch für die cytoplasmatisch orientierten Enzyme gelten könnte, sollten die noch fehlenden Transferasen durch Co-Immunpräzipitation mit bereits bekannten Proteinen gereinigt und identifiziert werden.

In einem zweiten Ansatz sollten mit Hilfe von Datenbanken, bisher nicht charakterisierte, für das Wachstum essentielle ORFs der Hefe aufgespürt werden, die Homologie zu bereits bekannten Glykosyltransferasen haben. Dabei waren vor allem die Hefedatenbank SGD, und die CAZY-Datenbank, in der unter anderem Glykosyltransferasen hinterlegt sind, hilfreich. Des Weiteren existiert für *S. cerevisiae* eine Datenbank, in der uncharakterisierte ORFs hinsichtlich potentieller Interaktionspartner untersucht wurden (*Yeast resource center*).

Der Schwerpunkt sollte bei der Identifizierung der UDP-GlcNAc:Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc Transferase (GNT) liegen, welche die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ katalysiert. Diese Enzymaktivität wurde bereits 1982 von Sharma und Lehle beschrieben und so war bereits ein Enzymtest in unserem Labor etabliert [88].

Die Identifizierung der GNT zeigte überraschenderweise einen Aufbau aus zwei getrennten Proteinen. Wobei eine Untereinheit, Alg14p, ein Membranprotein ist, die andere Komponente, Alg13, keine Transmembranspanne besitzt und sowohl membrangebunden als auch cytoplasmatisch vorliegt. So sollte zunächst die Membrantopologie von Alg14p geklärt werden und im Anschluß die Interaktion der Proteine, vor allem durch Aminosäureaustausche, charakterisiert werden. In einem weiteren Teil sollte untersucht werden, ob nur eine Untereinheit katalytisch aktiv ist, oder ob beide Proteine an der Übertragung von N-Acetylglukosamin beteiligt sind.

2. Ergebnisse

Identifizierung und Charakterisierung der UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc Transferase (GNT)

2.1 *In silico* Identifizierung der *Saccharomyces cerevisiae* Gene *YGL047W* und *YBR070C* als potentielle N-Acetylglukosamin- transferase.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der N-Acetylglukosamintransferase, die bei der Biosynthese des dolicholgebundenen Oligosaccharids N-Acetylglukosamin von UDP-GlcNAc auf Dol-PP-GlcNAc₁ unter Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ überträgt. Die ersten Hinweise, dass der noch uncharakterisierte *open reading frame* (ORF, YGL047W) der Hefe *S. cerevisiae* ein Glykosyltransferase Motiv enthält und eventuell für eine N-Acetylglukosamintransferase codieren könnte, stammten von Claude A. Jakob (ETH Zürich, persönliche Mitteilung). Laut der *S. cerevisiae* Datenbank (SGD) und der Proteindatenbank CAZY kann dieses Protein Ygl047wp, das Alg13p benannt wurde, in die Glykosyltransferasefamilie 28 (pfam04101) eingeordnet werden und besitzt homologe Bereiche zum C-Terminus des *E. coli* Enzyms MurG, das die Übertragung eines N-Acetylglukosaminrestes von UDP-GlcNAc auf N-Acetylmuramoyl Pentapeptid katalysiert. MurG ist an der Peptidoglycanbiosynthese beteiligt und die Struktur ist durch röntgenkristallographische Untersuchungen bereits aufgeklärt. Durch Co-Kristallographie mit UDP-GlcNAc ist die Substratbindestelle bereits bekannt. Sie liegt innerhalb von MurG in einem Bereich der Homologie zu Alg13p aufweist.

Die weiteren Untersuchungen von *ALG13* führten zu einem zweiten Protein, das ebenfalls an der Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂ beteiligt ist. In der genomweiten Protein-Protein Interaktionsdatenbank Yeast Resource Center (Seattle, WA) wurden die noch uncharakterisierten ORFs der Bäckerhefe hinsichtlich potentieller Interaktionspartner untersucht. Zur Analyse wurden diese ORFs mit Protein A fusioniert, über eine IgG Matrix aufgereinigt und das Eluat mit co-eluiierenden Proteinen über SDS-PAGE aufgetrennt. Die so erhaltenen Proteine wurden über MALDI TOF analysiert.

Diese Analyse ergab Proteine, die mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit mit dem jeweiligen ORF interagieren. Laut dieser Datenbank co-eluiieren insgesamt sieben Proteine mit Alg13p, darunter das essentielle Protein Ybr070cp, das von uns Alg14p genannt wurde. Interessanterweise weist dieses Protein eine glycinreiche Domäne auf, die möglicherweise einen sogenannten

Rossmann fold induzieren kann, von dem angenommen wird, eine Proteinstruktur zu bewirken die an der UDP-GlcNAc Bindung beteiligt sein könnte [84]. Weiter hat Alg14p sowohl Homologie zu dem N-terminalen Bereich des MurG Proteins aus *E. coli* als auch zu Cps14fp aus *Streptococcus pneumoniae* (Abb. 3). Es ist bereits gezeigt, dass *Cps14f* aus *Streptococcus pneumoniae* mit *Cps14g* interagiert und für eine β -1,4-Galaktosyltransferase codiert, die einen Galaktoserest überträgt und an der Biosynthese von Zellwandpolysacchariden beteiligt ist. Es handelt sich auch hierbei um eine Glykosyltransferase, die aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist.

Zu Alg13p und Alg14p existieren in vielen Eukaryoten – Hefe, Insekten, Säuger – homologe Proteine. Allerdings besteht in einem Fall, dem Trypanosom *Leishmania major*, Alg13p–Alg14p aus nur einem Protein mit 437 Aminosäuren in der analogen Anordnung wie im MurG Protein (*ALG14-ALG13*). Im Fall von *Entamoeba histolytica* kann ein Homolog identifiziert werden, das ebenfalls beide Domänen *ALG13* und *ALG14* enthält, jedoch in umgekehrter Anordnung (*ALG13-ALG14*).

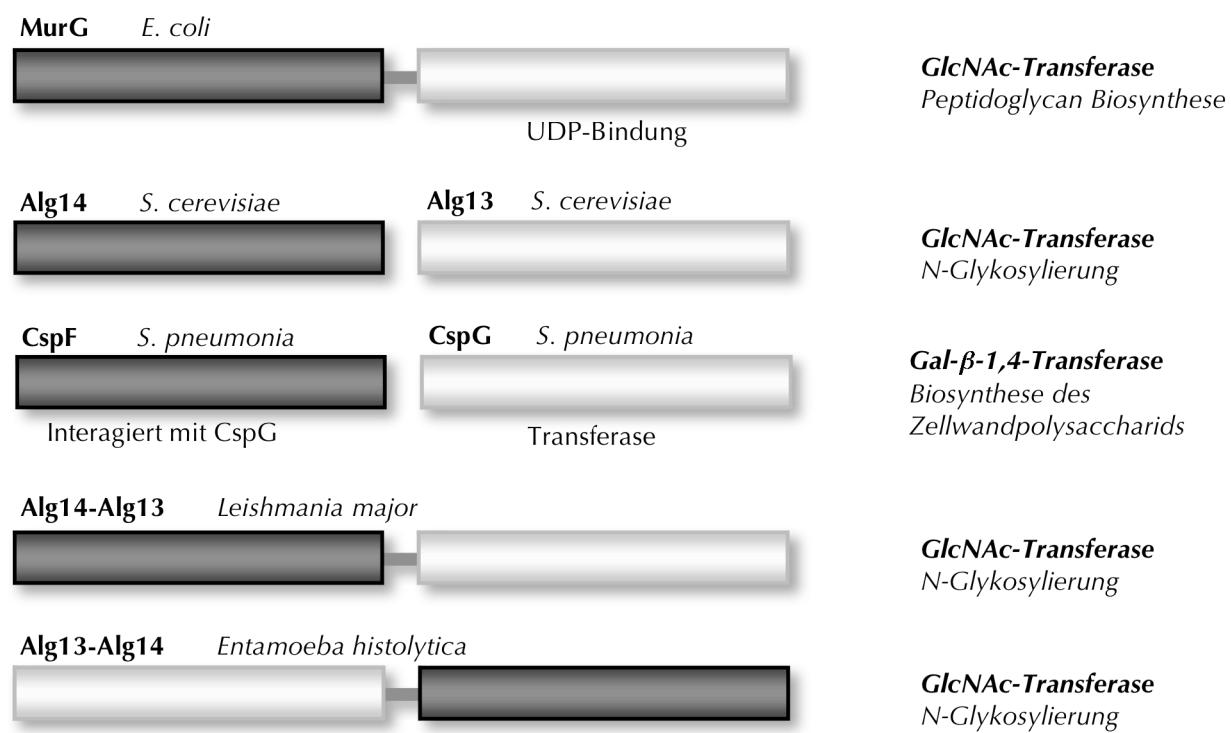


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anordnung der homologen Gene zu *ALG13* und *ALG14* in verschiedenen Organismen.

Zunächst beschränkten sich die Untersuchungen auf den erstgenannten ORF *YGL047W* – *ALG13*. Alg13p hat kaum hydrophobe Bereiche und keine Signalsequenz, die für die Lokalisation dieses Proteines im ER sprechen würde. In früheren *in vitro* Untersuchungen wurde die enzymatische Aktivität der UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc Transferase (GNT) aber in der Membranfraktion gefunden und der Aufbau des lipidgebundenen Oligosaccharids erfolgt ohne Frage an der

ER Membran [39, 45, 88]. So war als erstes zu klären, ob ein allen Vorhersagen nach lösliches Protein an der Übertragung eines N-Acetylglukosaminrestes an der ER Membran beteiligt sein könnte. Die Lokalisation von Alg13p wurde mit Hilfe eines C-terminal epitopmarkierten Fusionskonstrukts nachgewiesen, das mit der gängigen Methode des so genannten „*Protein tagging*“ hergestellt wurde (vgl. 6.2.13).

Im vorliegenden Fall wurden zwei Domänen des Protein A an *ALG13* fusioniert, was kurz als Alg13p^{ZZ} benannt wird.

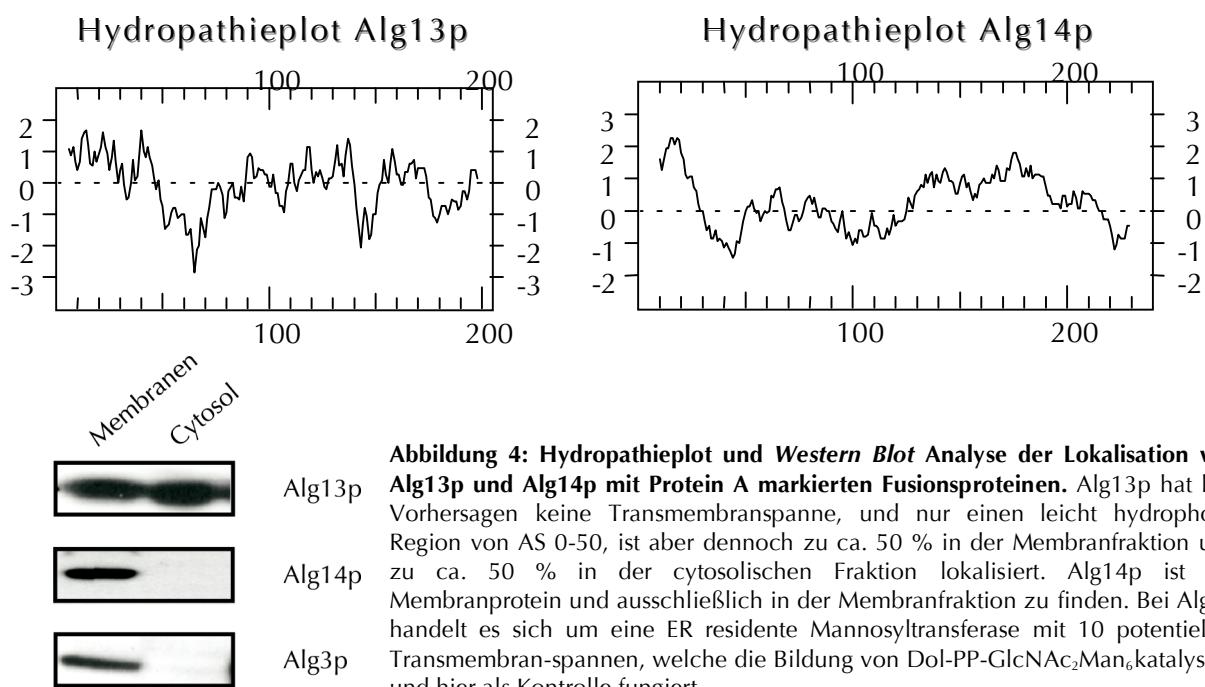


Abbildung 4: Hydropathieplot und Western Blot Analyse der Lokalisation von Alg13p und Alg14p mit Protein A markierten Fusionsproteinen. Alg13p hat laut Vorhersagen keine Transmembranspanne, und nur einen leicht hydrophobe Region von AS 0-50, ist aber dennoch zu ca. 50 % in der Membranfraktion und zu ca. 50 % in der cytosolischen Fraktion lokalisiert. Alg14p ist ein Membranprotein und ausschließlich in der Membranfraktion zu finden. Bei Alg3p handelt es sich um eine ER residente Mannosyltransferase mit 10 potentiellen Transmembran-spalten, welche die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂Man₆katalysiert und hier als Kontrolle fungiert.

In Abbildung 4 ist die Lokalisation von Alg13p dargestellt. Erstaunlicherweise wurde das lösliche Protein Alg13p sowohl in der Membranfraktion als auch in der cytosolischen Fraktion gefunden. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob Alg13p, trotz fehlender Membranspanne, fest in der Membran verankert ist, oder nur peripher mit der Membran assoziiert vorliegt. Die folgenden Untersuchungen beschränkten sich auf membrangebundenes Alg13p^{ZZ}, das mit verschiedenen Kombinationen aus Salz und Detergenz behandelt wurde, um so die Interaktion mit der Membran näher zu charakterisieren.

Eine gängige Methode, um membranassoziierte Proteine von Membranproteinen zu unterscheiden, ist die Behandlung der Membranfraktion mit Salz, wie z.B. 500 mM NaCl. Proteine, die über ionische Wechselwirkungen nur peripher mit der Membran assoziiert sind, lösen sich unter Hochsalz-Bedingungen von der Membran, wohingegen Proteine, die mit einer hydrophoben Transmembrandomäne die Membran durchspannen in der Membran verankert bleiben.

Transmembranproteine können mit Detergenz solubilisiert werden. Dabei werden Membranmicellen gebildet, wodurch die Proteine aus der ursprünglichen Membranumgebung herausgelöst werden.

Solubilisierung Alg13p^{ZZ}

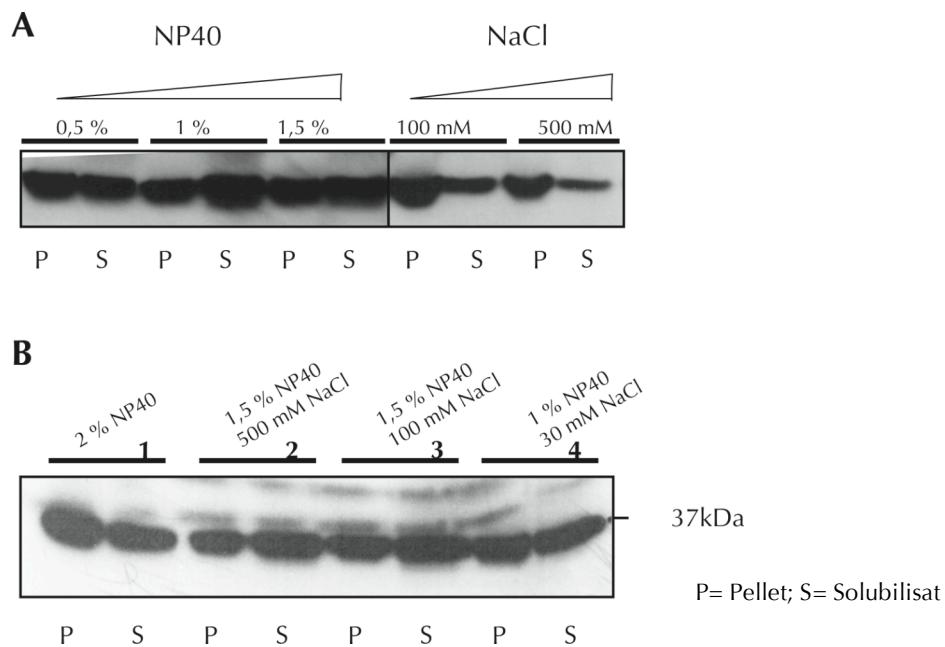


Abbildung 5: Western Blot Analyse von verschiedenen Solubilisierungen der membrangebundenen Fraktion von Alg13p. Äquivalente Mengen von Solubilisat und Pellet wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Western Blot Analyse detektiert. Die in Abb. 8 A dargestellten Versuche zeigen die Solubilisierung von Alg13p^{ZZ} mit ausschließlich NP40 bzw. Salz (NaCl). Verschiedene Kombinationen von Detergenz und Salz wurden in den in Abb. 8 B dargestellten Versuchen verwendet, um Alg13p aus der Membran herauszulösen (1-4). Peripher mit der Membran assoziierte Proteine sollten sich bei einer Konzentration von 500 mM NaCl von der Membran ablösen lassen.

In Abbildung 5 ist zu sehen, dass sich die Solubilisierung von membrangebundenem Alg13p in Anwesenheit von 0,5 %, 1 %, oder 1,5 % Detergenz kaum unterscheidet (Abb. 5 A). Die Verwendung von Salz zur Ablösung von peripher mit der Membran assoziiertem Alg13p zeigte, dass der Hauptteil von Alg13p in der Membran verankert bleibt. Die Behandlung der Membranfraktion mit 500 mM statt 100 mM NaCl erbrachte keine Steigerung der löslichen Fraktion von Alg13p.

Auch der Einsatz einer Kombination von Detergenz und Salz änderte die Solubilisierungseigenschaften nicht gravierend (Abb. 5 B-2 und 5 B-3).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Interaktionspartner in der ER Membran postuliert. Dieser, von uns als Alg14p bezeichnet, und dessen Erfordernis für die Enzymaktivität wird im Folgenden näher beleuchtet.

2.2 Die Reprimierung von *ALG13* und *ALG14* hat *in vivo* einen Defekt in der Protein-N-Glykosylierung und die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc₁ zur Folge

Zunächst sollten die Gene *ALG13* und *ALG14* hinsichtlich der N-Acetylglukosamintransferase-Aktivität untersucht werden. Beide Gene sind in *S. cerevisiae* essentiell, weshalb ihre Funktion nicht mit einer Deletionsmutante untersucht werden konnte. Infolgedessen wurden Hefezellen verwendet, die Tetracyclin (P_{TET}) oder Galaktose (P_{GAL}) regulierbare Promotoren vor den jeweiligen Genen, *ALG13* oder *ALG14*, genomisch integriert haben. Bei dem verwendeten Tetracyclin abhängigen Promotor handelt es sich um das *tet-off* System, dem das von Gossen und Bujard 1992 entwickelte Prinzip zu Grunde liegt [109, 110]. Durch Zugabe von Tetracyklin wird der Promotor reprimiert und so die Expression des Gens unter Kontrolle dieses Promoters verhindert. Bei der Beschreibung der Abbildungen deutet ein „+“ Zeichen die Expression des jeweiligen Gens an, ein „-“ Zeichen dessen Repression.

Die Beteiligung der Gene *ALG13* und *ALG14* an der Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ wurde zunächst *in vivo* gezeigt. Dazu wurden Hefezellen *in vivo* mit [³H]Glukosamin und [³H]Mannose markiert. Die Hefestämme stammten aus einem EUROFAN Projekt ($P_{TET}ALG13$) beziehungsweise aus der Hughes Kollektion ($P_{TET}ALG14$).

Zunächst sollte die Zeit ermittelt werden, die nötig ist, um Alg13p durch Zugabe von Tetracyclin soweit zu reprimieren, um einen Effekt auf die N-Glykosylierung zu erzielen. Zur Kontrolle wurde der gleiche Hefestamm ohne Tetracyclin angezogen. Im Versuch wurden 4×10^4 Zellen/ml für insgesamt 48 h mit 300 µg/ml Tetracyclin inkubiert. Die Funktionalität des Enzyms wurde durch die Analyse des Glykosylierungsstatus der Carboxypeptidase Y (CPY) überprüft. Die CPY ist ein vakuoläres Glykoprotein mit insgesamt vier Glykosylierungsstellen, was zu einer apparenten molekularen Masse von ca. 61 kDa führt. Ist Alg13p/Alg14p inaktiv, kann Dol-PP-GlcNAc₁ nicht zum Volllängen LLO verlängert werden. Dadurch kommt es zu einem Mangel an Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ und es sind nicht vollständig glykosyierte Formen der CPY detektierbar. Die Unterglykosylierung, das heißt die unvollständige Übertragung von Zuckerketten ist sichtbar durch weitere, leichtere Banden, da sich das Fehlen einer Zuckerstange durch einen Verlust von etwa 2 kDa bemerkbar macht. *In vivo* wurde die Übertragung der Zuckerketten auf das Glycoprotein CPY über den gesamten Zeitraum verfolgt und ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die Detektion der CPY erfolgte mittels *Western Blot* Analyse und eines monoklonalen anti-CPY Antikörpers.

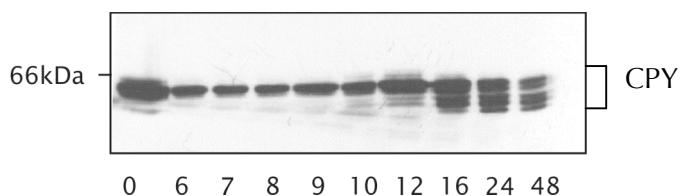


Abbildung 6: Western Blot Analyse der Glykosylierung der CPY bei reprimiertem Alg13p über 48 h. Die jeweiligen Zeiten (zwischen 0 und 48 h) sind jeweils unter der Spur vermerkt. Die fünf Proteinbanden, die in den Spuren 24 h und 48 h Inkubationszeit mit Tetracyclin zu sehen sind, spiegeln die Formen der CPY von vierfach glykosyliert (oberste Bande) bis zu CPY ohne N-glykosidisch gebundener Zuckerkette (unterste Bande) wider.

In Abbildung 6 ist zu sehen, dass bei der Repression von Alg13p die Unterglykosylierung der CPY nach etwa 16 h bemerkbar wurde, nach 24 h war eine deutliche Unterglykosylierung zu sehen. Dieser Effekt verstärkte sich nur unwesentlich, wenn Alg13p für 48 h reprimiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Alg13p ein essentielles Protein ist und die Hefezellen sich ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr weiter teilen. Deshalb wurden sämtliche Experimente, soweit nicht anders vermerkt, bei einer Inkubationszeit mit Tetracyclin von 24 h durchgeführt.

Die Beteiligung von Alg13p an der Protein-N-Glykosylierung war durch dieses Experiment bereits nachgewiesen. Der genaue Schritt, an dem Alg13p innerhalb der Assemblierung des Oligosaccharids beteiligt ist, blieb jedoch noch offen. Eine *in vivo* Markierung von Hefezellen mit [³H]Glucosamin bzw. [³H]Mannose und die Analyse der daraus gewonnenen lipidgebundenen Oligosaccharide (LLO, *lipid linked oligosaccharides*) sollte zeigen, an welchem Schritt der LLO Biosynthese diese Proteine beteiligt sind.

Die für 24 h mit bzw. ohne Tetracyclin angezogene Hefekultur wurde mit [³H]Glukosamin in Vollmedium für 30 min bzw. mit [³H]Mannose für 15 min inkubiert. Die lipidgebundenen Oligosaccharide wurden durch mehrere Chloroform/Methanol/Wasser Extraktionen isoliert und durch Dünnschichtchromatographie analysiert (vgl. 6.3.7 und 6.3.8). Die Zuordnung der detektierten Peaks erfolgte mit Hilfe definierter Referenzverbindungen. Im Falle der längerkettigen LLOs (GlcNAc₂Man₁ bis GlcNAc₂Man₉Glc₃) wurde die Oligosaccharidfraktion nach milder Hydrolyse mittels HPLC analysiert. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem Durchflusszintillationszähler quantifiziert.

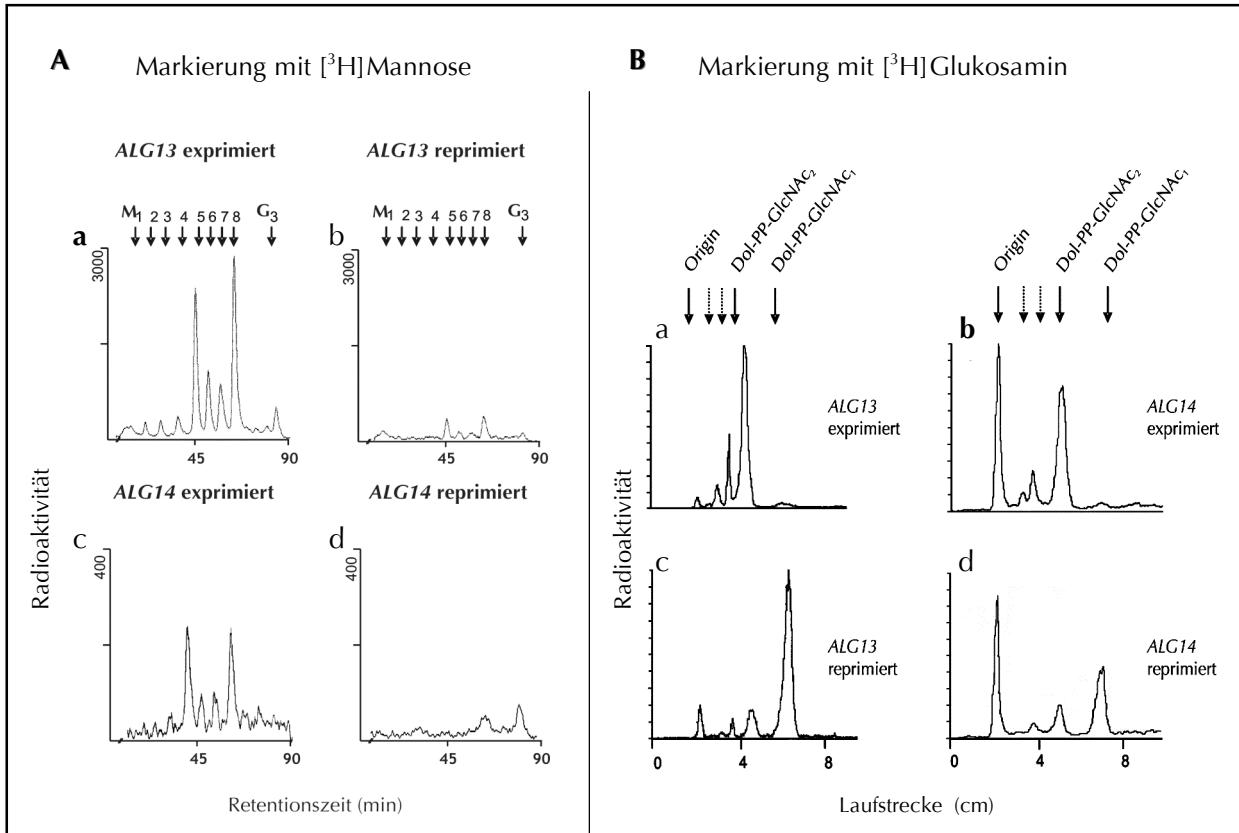


Abbildung 7: Analyse der Oligosaccharidfraktion nach *in vivo* Markierung mit $[^3\text{H}]$ Mannose (A) oder $[^3\text{H}]$ Glukosamin (B). Die HPLC-Analyse des LLO Pools der Mannosemarkierung zeigte, dass bei Abwesenheit von Alg13p oder Alg14p kaum Oligosaccharide, die Mannose enthalten gebildet wurden (7 A-b und 7 A-d). Hingegen in Hefestämmen, die Alg13p und Alg14p exprimieren, erfolgte die Synthese des Volllängen Oligosaccharids Dol-PP-GlcNAc $_2$ Man $_9$ Glc $_3$ (7 A-a und 7 A-c). Wurden die ersten Schritte der Oligosaccharidbiosynthese durch Markierung mit radioaktivem $[^3\text{H}]$ GlcNAc untersucht, zeigten die Hefezellen, die entweder nur Alg13p (7 B-d) oder nur Alg14p (7 B-c) exprimierten die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc $_1$. Die gepunkteten Pfeile markieren Oligosaccharide die bereits einen bzw. zwei Mannosereste tragen. Die lipidgebundenen Zucker nach $[^3\text{H}]$ Glucosaminmarkierung wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt und analysiert.

In Abbildung 7 ist die Analyse der markierten Zucker dargestellt. Die Mannosemarkierung (Abb. 7 A) zeigte einen fast vollständige Verlust von längerkettigen $[^3\text{H}]$ Mannose markierten LLOs in Hefezellen, die Alg13p bzw. Alg14p reprimierten (Abb. 7 A-b und 7 A-d). Offensichtlich war einer der initialen Schritte der LLO Biosynthese durch die Repression von Alg13p bzw. Alg14p betroffen. Dagegen wies die $[^3\text{H}]$ Mannosemarkierung von Zellen die *ALG13* und *ALG14* exprimierten das typische Muster bis hin zu GlcNAc $_2$ Man $_9$ Glc $_3$ auf (Abb. 7 A-a, 7 A-c). Aus der $[^3\text{H}]$ Glucosaminmarkierung ging hervor, dass Dol-PP-GlcNAc $_1$ in diesen Zellen akkumulierte, so dass kein Dol-PP-GlcNAc $_2$ verfügbar war, das verlängert werden konnte (Abb. 7 B-c, 7 B-d).

In vivo bewirkte sowohl die Repression von Alg13p, als auch von Alg14p die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc $_1$, was bedeutet, dass beide Proteine für die Bildung von Dol-PP-GlcNAc $_2$ nötig sind.

Die physikalische Interaktion der beiden Proteine wurde über die Aufreinigung der epitopmarkierten Variante von Alg14p^{ZZ}, bei gleichzeitiger Expression von Alg13p^{myc} nachgewiesen. Hierzu wurde ein Detergenz solubilisierter Extrakt aus Mikrosomenisolat von

Hefezellen hergestellt, die sowohl Alg13p^{myc} als auch Alg14p^{ZZ} exprimierten und über eine IgG Sepharose Matrix aufgereinigt. Dabei interagierte das ZZ Epitop mit an der Matrix immobilisiertem IgG. Als Kontrolle wurde eine Sepharosematrix ohne verknüpftes IgG verwendet (vgl. 6.3.12).

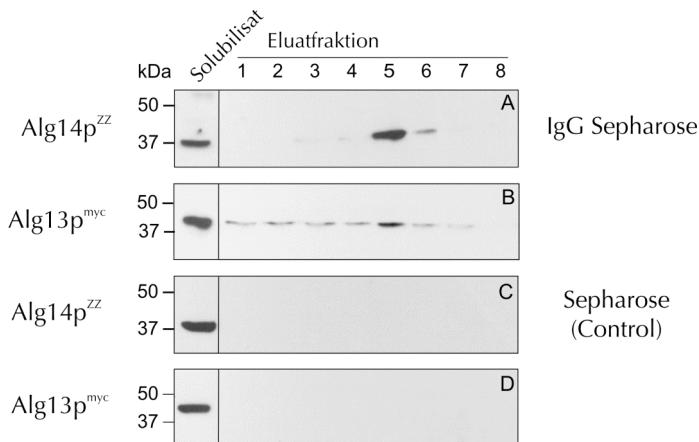


Abbildung 8: Western Blot Analyse der Co-Elution von Alg13p^{myc} mit Alg14p^{ZZ}. Alg14p^{ZZ} wurde über Protein A an IgG Sepharosematrix immobilisiert. Die Elution der Proteine erfolgte über einen pH Sprung durch einen Puffer pH 3. Beide Proteine co-eluiieren in Fraktion 5, (A, B) wohingegen die Kontrolle, bei der unmodifizierte Sepharose als Matrix verwendet wurde, kein Protein gebunden war (C, D).

Abbildung 8 stellt die *Western Blot* Analyse von acht Eluatfraktionen dar. Obwohl Alg13p in geringen Mengen in fast allen Fraktionen von der Säule gewaschen wurde, co-eluiieren beide Proteine mit einem Maximum in Eluatfraktion No. 5. Die Kontrolle mit Sepharosematrix ohne gebundenes IgG zeigte kein unspezifisch gebundenes Protein (Abb. 8 C und D). Dies belegt, dass die Bindung von Alg13p und Alg14p spezifisch war.

2.3 Alg13p und Alg14p katalysieren die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ *in vitro*

Im Abschnitt 2.2 wurde beschrieben, dass Alg13p und Alg14p *in vivo* für die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ nötig sind und miteinander interagieren. Im Folgenden wird nun die UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc-Transferaseaktivität auch *in vitro* bestimmt. Dazu wurden einerseits die Membranfraktion, als auch das Mikrosomensolubilisat aus Hefezellen, die entweder ausschließlich Alg13p ($P_{TET}ALG14$) oder ausschließlich Alg14p ($P_{TET}ALG13$) exprimierten, mit UDP-[¹⁴C]GlcNAc inkubiert. In einem weiteren *in vitro* Test wurde Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₁ als Akzeptor und unmarkiertes UDP-GlcNAc als Glykosyldonor zu Dol-PP-GlcNAc₂ verlängert (6.3.10). Auch in diesen Versuchen konnte die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ nur dann beobachtet werden, wenn beide Proteine vorhanden waren (Abb. 9 A und 9 B). Die Aktivitätsbestimmung, die in Abbildung 9 B dargestellt ist, zeigte, dass die Übertragung von GlcNAc auf Dol-PP-GlcNAc₁ von der insgesamt eingesetzten Proteinmenge abhängt (Abb. 9 B, Spur 2 und 3). Dies wurde genauer untersucht, indem die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Expression von Alg13p über quantitative *Western Blot* Analyse und Enzymaktivitätsbestimmung in der korrespondierenden Membranfraktion bestimmt wurde. Dazu wurde die Expression von Alg13p^{ZZ} in Hefezellen $P_{TET}ALG13-ZZ$ über insgesamt 48 h verfolgt und zu definierten Zeiten analysiert. Die

Signale der *Western Blot* Analyse wurden mit dem Fluoroimager (BIORAD) aufgenommen und mit der Software OptiQant (PACKARD INSTRUMENTS CO.) quantifiziert. Die Enzymaktivitätsbestimmung in Mikrosomensolublisat erfolgte wie in den vorherigen Versuchen (6.3.10). Daraus ergab sich die in Abbildung 9 C dargestellte Korrelation. Bereits nach sieben Stunden nahm sowohl die GNT Aktivität als auch die in der Zelle vorhandenen Alg13p Konzentration stark ab. Obwohl *in vivo*, wie in Abb. 6 dargestellt, die Unterglykosylierung der CPY erst nach 16 h bemerkbar wurde, ist zu diesem Zeitpunkt die *in vitro* Aktivität der GNT bereits auf weniger als 20 % gesunken. Dieser Umstand ist auf die Halbwertszeit der CPY zurückzuführen. Die Detektion der CPY erfolgte mittels *Western Blot* Analyse, bei der nicht die Neusynthese der CPY detektiert wurde, sondern die insgesamt in der Zelle vorhandene CPY. So konnten noch 4-fach glykosylierte Formen der CPY detektiert werden, obwohl die tatsächliche Aktivität der GNT bereits weiter abgenommen hatte.

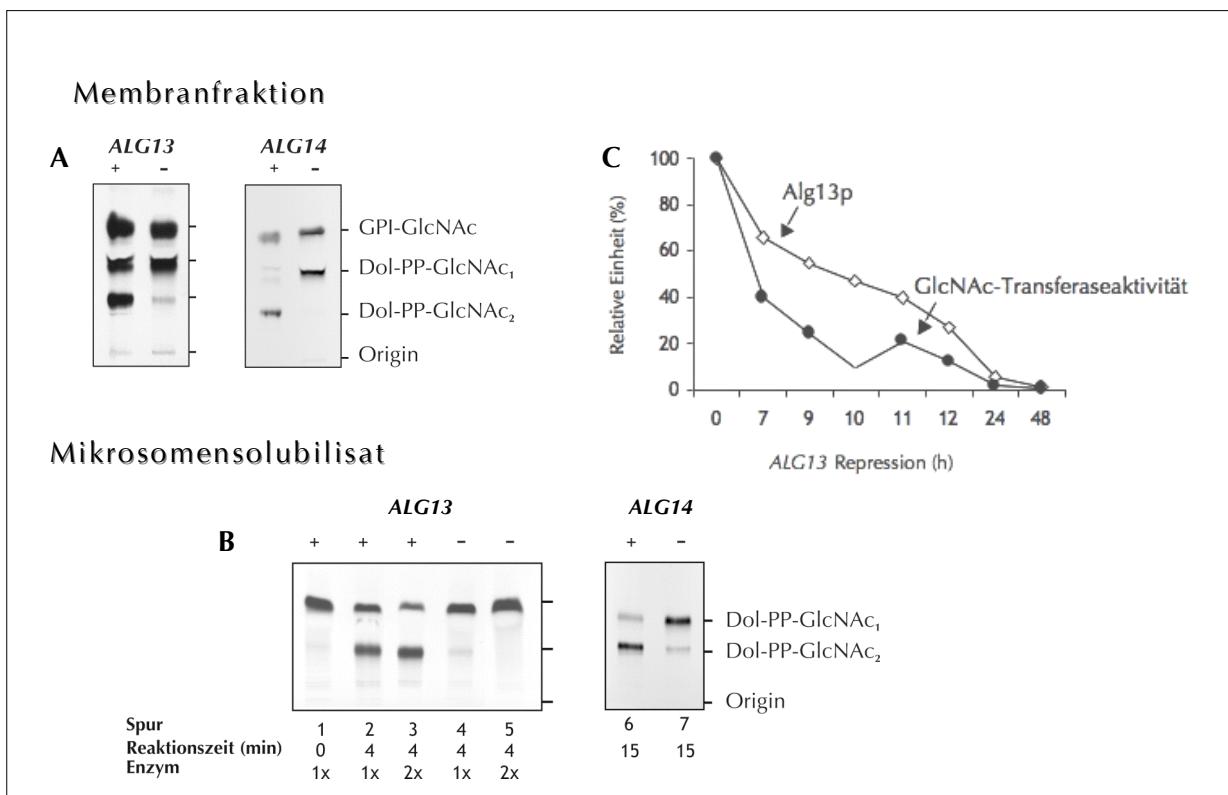


Abbildung 9: *In vitro* Aktivität von Mikrosomen und Mikrosomensolublisat. „+“ deutet die Expression des jeweiligen Gens an, „-“ dessen Repression. Die Enzymaktivität in Mikrosomen, in denen jeweils nur Alg13p bzw. Alg14p exprimiert wurde, ebenfalls die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc. Die Bildung von GPI-GlcNAc war von der Repression der beiden Gene jedoch nicht betroffen (A). Das gleiche Ergebnis lieferte ein Enzymtest mit einem Mikrosomensolublisat (B). Dabei war die Verlängerung von Dol-PP-GlcNAc₁ zu Dol-PP-GlcNAc₂ abhängig von der Enzymmenge von Alg13p (9 B, Spur 2, 3). Die Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der Expression von Alg13p, die über quantitative *Western Blot* Analyse ermittelt wurde, zeigt Abb. 9 C.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigte die jeweilige Repression der einzelnen Proteine Alg13p und Alg14p keine Verlängerung von Dol-PP-GlcNAc₁. In allen Versuchen waren beide Enzyme nötig. Wie unter 2.1, Abb. 3 beschrieben, liegt laut Homologievergleichen die Substratbindestelle für UDP-GlcNAc im Alg13 Genprodukt. Durch Experimente, bei denen die Aktivität in einem Immunpräzipitat von Alg13p^{ZZ} in An- und Abwesenheit von Alg14p bestimmt wurde, sollte die Erfordernis beider Proteine für die *in vitro* Übertragung eines N-Acetylglukosaminrestes untersucht werden. Die verwendeten Hefezellen exprimierten genomisch integriert Alg13p^{ZZ}, die *ALG14* Expression wurde durch den Tetracyclin reprimierbaren Promotor reguliert. Die Immunpräzipitation erfolgte im sogenannten „batch“ Verfahren. Als Kontrolle diente, wie schon bei der in Abbildung 8 beschriebenen Co-Immunpräzipitation, Sepharosematrix ohne gebundenen IgG Antikörper. Infolgedessen konnte das identische Solubilisat für beide Versuchsansätze verwendet werden.

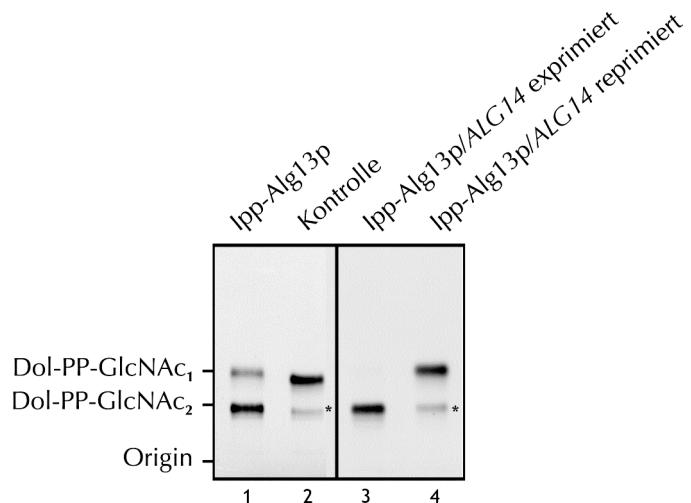


Abbildung 10: GNT Aktivität im Immunpräzipitat (Ipp) von Alg13p^{ZZ}. Die verwendeten Hefestämme exprimierten jeweils das epitopmarkierte Fusionsprotein Alg13p^{ZZ}. In Spur 3 und 4 wurden P_{TET}*ALG14*/*ALG13-ZZ* Hefezellen verwendet. Die Präzipitation von Alg13p mit IgG Sepharose erfolgte wie unter 6.3.12 beschrieben. Als Kontrolle diente Sepharosematrix ohne IgG. Die mit * markierten Banden sind Verunreinigungen von Dol-PP-GlcNAc₂ die aus der Substratpräparation stammen. Die Glykolipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt.

Abbildung 10 zeigt die Dünnschichtanalyse eines *in vitro* Aktivitätstests. Das Immunpräzipitat von Alg13p^{ZZ} war aktiv und zeigte fast vollständige Verlängerung von Dol-PP-GlcNAc₁ zu Dol-PP-GlcNAc₂. Wurde aber ein Solubilisat aus Hefezellen eingesetzt, die Alg14p nicht exprimieren, war keine GlcNAc Transferaseaktivität meßbar (Abb. 10 Spur 4). Auch dieser Test zeigte, dass beide Proteine für die Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂ nötig sind.

Alg14p wurde zunächst über die Interaktion mit Alg13p^{ZZ} gefunden. In Abb. 10 Spur 4 wird ersichtlich, dass ein Immunpräzipitat von Alg13p^{ZZ}, ohne Alg14p, die Übertragung von UDP-GlcNAc auf Dol-PP-GlcNAc₁ nicht katalysiert, was zu der Frage führt, ob die membrangebundene Fraktion von Alg13p auch dann existiert, wenn Alg14 nicht exprimiert wird.

2.4 Alg14p rekrutiert Alg13p an die ER Membran

Wie bereits erwähnt, gibt die Aminosäuresequenz von Alg13p keine Hinweise auf eine Transmembranspanne. Dennoch zeigte das epitopmarkierte Fusionskonstrukt Alg13p^{ZZ}, dass Alg13p sowohl membrangebunden, als auch löslich im Cytoplasma vorliegt (Abb. 4) wohingegen die Enzymaktivität in der Membranfraktion gefunden wurde (Abb. 9). Alg14p dagegen ist ein Membranprotein und demzufolge nur in der Membranfraktion zu finden (Abb. 4). Im Folgenden wird die Membranlokalisierung von Alg13p in Abhängigkeit der *ALG14* Expression untersucht. Mit Hilfe des verwendeten Hefestammes P_{TET}*ALG14/ALG13-ZZ* konnte die Lokalisation von Alg13p bei Repression von Alg14p verfolgt werden.

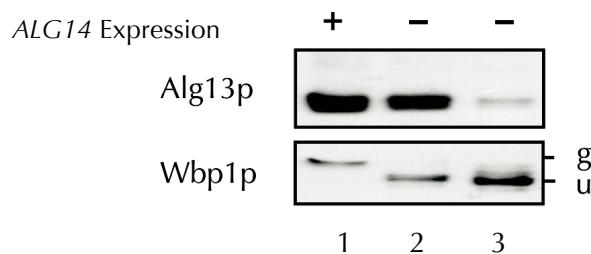


Abbildung 11: Membranlokalisierung von Alg13p bei Repression von Alg14p. Der verwendete Hefestamm P_{TET}*ALG14* exprimierte das Fusionsprotein Alg13p^{ZZ}. „+“ steht für die Expression von *ALG14*, „-“ für dessen Repression. Spur 1 zeigt das Signal von Alg13p in der Membran wenn Alg14p exprimiert wurde. In den Spuren 2 und 3 war *ALG14* für 16 h (2) bzw. 27 h (3) reprimiert, was eine Verringerung von Alg13p in der Membranfraktion zur Folge hatte. Wbp1p ist eine Untereinheit des OST Komplexes und damit ein ER Protein, das hier als Ladungskontrolle diente. Wbp1p ist selbst ein Glykoprotein, das bei *ALG14* Expression in glykosylierter Form (g), bei *ALG14* Repression unglykosyliert (u) vorliegt.

Durch den in Abbildung 11 dargestellten *Western Blot* wird deutlich, dass die Bindung von Alg13p an die Membran abhängig ist von der Expression von Alg14p. Je länger Alg14p reprimiert wurde, desto weniger Alg13p war in der Membranfraktion lokalisiert. Wbp1p ist ein essentielles Protein des Oligosaccharyltransferase-Komplexes (OST) und selbst ein Glykoprotein mit drei Glykosylierungsstellen (g). Die leichtere Bande in den Spuren 2 und 3, die mit „u“ gekennzeichnet sind, repräsentiert die unglykosylierte Form dieses Proteins, die aufgrund der Repression von *ALG14* auftritt. Wbp1p diente als Ladungskontrolle und demonstriert, dass das schwächere Signal von Alg13p, das in Spur 3 detektiert wurde, nicht auf einen Verlust an Gesamtprotein in dieser Spur zurückzuführen war.

Die funktionelle Untersuchung der cytosolischen Fraktion von ist in Abbildung 12 dargestellt. Während das Immunpräzipitat von solubilisiertem Alg13p^{ZZ} zu einem fast vollständigen Umsatz zu Dol-PP-GlcNAc₂ führte, wurde im Immunpräzipitat aus cytosolischem Alg13p^{ZZ} kein Dol-PP-GlcNAc₂ gebildet. Dieses Ergebnis steht in Enklang mit den vorherigen *in vivo* Untersuchungen hinsichtlich der Enzymaktivität in Zellen die *ALG14* reprimieren (vor allem

Abb. 7 B-d und Abb. 9) und zeigt, dass beide Proteine für die Bildung einer aktiven GlcNAc Transferase *in vivo* und *in vitro* essentiell sind.

Weitere Untersuchungen von verschiedensten Kombinationen aus Alg13p und Alg14p werden in Kapitel 2.6 beschrieben.

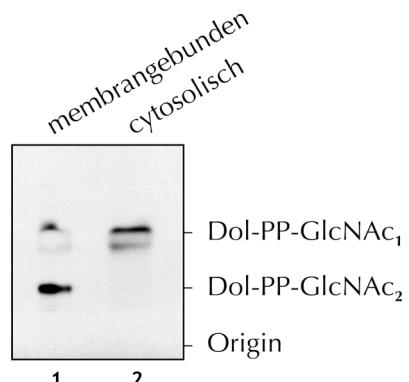


Abbildung 12: Analyse der Glykolipidfraktion aus einem *in vitro* GlcNAc Transferasetest. Alg13p^{ZZ} wurde mittels einer IgG Sepharosematrix immunpräzipitiert und die GNT-Aktivität untersucht. Die cytosolische Fraktion von Alg13 besitzt keine GNT Aktivität.

Wie in Abbildung 12 beschrieben, besitzt die cytosolische Fraktion von Alg13p keine GNT Aktivität. Da es sich um ca. 50 % des in der Zelle vorhandenen Alg13p handelt (vgl. Abb. 4), wurden mehrere Ansätze verfolgt, um für die lösliche Fraktion des Proteins eine weitere mögliche Funktion zu finden.

Neben der *N*-Glykosylierung ist die cytoplasmatische O-GlcNAc Glykosylierung eine weitere Form der Proteinmodifikation. In Niederen Eukaryoten ist diese Modifikation zwar noch nicht experimentell gezeigt, aber aus Untersuchungen in Säugerzellen sind einige Aminosäuren an Proteinen identifiziert, die alternativ sowohl durch O-GlcNAc modifiziert, als auch phosphoryliert sind. Weiter ist aus dem Säugersystem bekannt, dass die Kaseinkinase durch die Übertragung eines O-GlcNAc Restes modifiziert wird [105]. Um zu überprüfen, ob die lösliche Fraktion von Alg13p das Enzym sein könnte, das in *S. cerevisiae* die Übertragung von N-Acetylglukosamin auf cytoplasmatische und nukleäre Proteine katalysiert, wurde die Kaseinkinase sowohl mit einem cytosolischen Extrakt aus Hefezellen, die Alg13p^{ZZ} überexprimieren, als auch mit einem daraus gewonnenen Immunpräzipitat und UDP-[¹⁴C]GlcNAc inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität sowohl mit Hilfe eines Proportionalzählrohrs, als auch mit einem Röntgenfilm detektiert. Wenn Alg13p GlcNAc auf cytoplasmatische Proteine übertragen kann, sollte radioaktiv markierte Kaseinkinase nachweisbar sein. Im Experiment konnte jedoch keine Übertragung gefunden werden.

In einem zweiten Ansatz diente Alg13p selbst als Substrat. Der Threoninrest T178 kann laut einem Vorhersageprogramm (NetOglyc) sowohl phosphoryliert als auch durch O-GlcNAc modifiziert werden. Auch in diesem Fall wurde die Übertragung anhand radioaktiv markiertem GlcNAc auf

Alg13p analysiert. Aber auch dieses Experiment ergab keine Hinweise für eine *O*-GlcNAc Modifikation in *S. cerevisiae*.

Da mit diesen Ansätzen keine Anhaltspunkte hinsichtlich der Funktion der cytosolischen Fraktion von Alg13p zu erzielen war, sollte die Notwendigkeit der löslichen Fraktion von Alg13p für die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* untersucht werden.

2.5 Das Fusionskonstrukt aus *ALG14* und *ALG13* bildet ein aktives Enzym

Während der Untersuchungen des Alg14 Proteins wurde deutlich, dass ein Alg14p Fusionprotein mit dem C-terminalen Protein A-Epitop zu einem inaktiven Enzym führte. Deshalb wurden alle weiteren Konstrukte mit einem Epitop fusioniert, das *in vivo* durch Übertragung von Biotin modifiziert wird. Das „BIO-Epitop“ enthält die minimale Sequenz, die nötig ist, um von der Protein-Biotin Ligase erkannt und modifiziert zu werden. Der Nachweis im *Western Blot* erfolgte mit einem Streptavidin-Peroxidase Konjugat, das die spezifische und starke Avidin–Biotin Interaktion ausnützt. Die codierende Sequenz von *ALG13* wurde über ein Glycin-Serin Bindeglied C-terminal an *ALG14* fusioniert. Ferner wurde das Startmethionin von Alg13p durch ein Alanin ersetzt (Abb. 13), so dass die Möglichkeit einer unabhängigen Alg13p Expression ausgeschlossen werden konnte. Im Protein MurG, das aus einer Polypeptidkette aufgebaut ist, finden sich im N-terminalen Bereich Homologien zu *ALG14*, im C-terminalen Bereich zu *ALG13* (vgl. Abb. 14). Auch im *Leishmania major* Homolog zu Alg14-Alg13p tritt diese Anordnung auf. Dieses Proteinalignment diente als Vorlage für das Fusionskonstrukt.

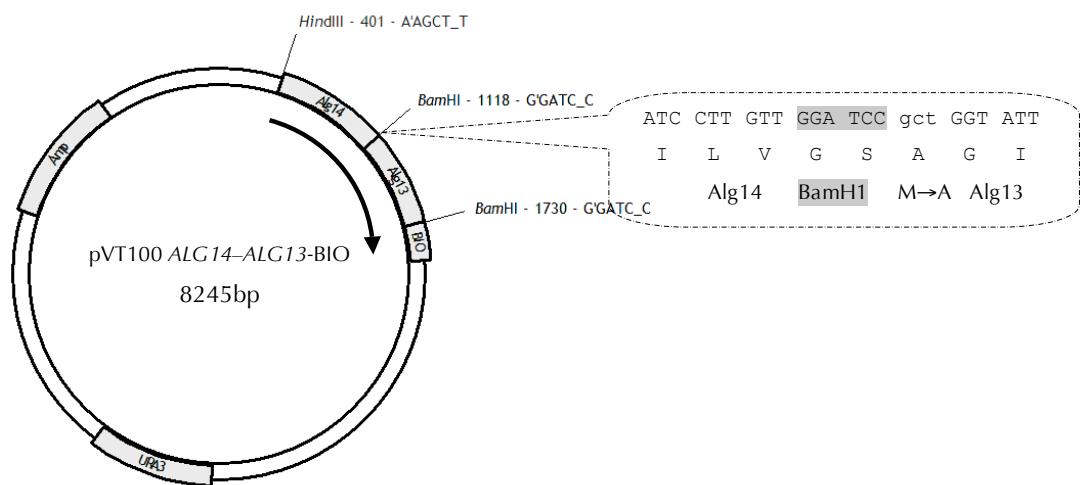


Abbildung 13: Klonierungsstrategie des Fusionskonstruktes Alg14-Alg13p^{BIO}. Der Glycin-Serin Linker und der Austausch des Startmethionins gegen Alanin sind anhand der DNA Sequenz gekennzeichnet.

Neben der Fusion aus den beiden Volllängenenzymen Alg14p und Alg13p wurde auch ein Fusionsprotein generiert, bei dem *ALG14* C-terminal um 86 Aminosäuren verkürzt war (Alg14-151). Das hoch konservierte Motiv GS/TGGH, das in allen Homologen von Alg14p vorkommt, liegt im N-terminalen Bereich des Proteins (Abb. 14). Unter der Annahme, dass der C-terminale Bereich von Alg14p für die Interaktion mit Alg13p nötig sein könnte, wäre somit ein Fusionskonstrukt ohne die postulierte C-terminale Interaktionsdomäne auch dann noch aktiv, wenn beide Proteine miteinander fusioniert sind. Die weiteren konservierten Aminosäurebereiche ¹⁶²NGPXC¹⁶⁶, ¹⁸⁹IVYXES¹⁹⁴ und ²⁰²SLTG²⁰⁵ sind innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert, kommen aber nicht im MurG Protein vor. Durch die Analyse des verkürzen Fusionskonstrukts

sollten erste Hinweise über den C-terminalen Bereich und dessen Funktion im Alg14 Protein gewonnen werden.

<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	MK TAY LAS L V	LIVS TAYVIR	LIAI LPFFHT	QAG TEKD TKD	GVNL LKIRKS	50
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	1	- - - MWFLIA	LLL GCAFLAS	LWHS VVRYVP	- - -	- LAIRSP	32
<i>E. coli</i> MurG	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- MMS	3
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	51	SKKP LKIF VF	LGSGGH T GEM	I RLL ENY - Q	D LLLGKS IVY	LGYS D E ASRQ	98
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	33	HRCAM KIGVV	LGSGGH T SEM	LRAITE I PLS	YWLD TRPFYV	VSA TD PH S AS	82
<i>E. coli</i> MurG	4	GQGKRLM VMA	GGT GHHV FPG	LAVAHHL - -	- MAQGWQ VRW	LGTAD RM EAD	49
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	99	RFA HF IKKFG	HCKVK YYEFM	KAREVKAT LLL	QSVKTI I GTL	VQS FVHV VR I	148
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	83	LASQLE QQRF	ERRVVV Y TIP	RAREVG QSYL	MSIITTIR - -	- A TLLACF	126
<i>E. coli</i> MurG	50	LVPKHG - -	- IEIDFIRIS	GLRGKG IKAL	IAAPLRI FN -	- - -	83
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1
X							
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	149	RFA MC GSP PHL	FLLNGPGTCC	- IISFWL KIM	ELLPL L LGSS	HIVYVES LAR	197
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	127	R FVCT EKP DV	LLTN GP GVCV	PVI AAAA VCV A	SCAP PWY GRP	AIVYME SFTC	176
<i>E. coli</i> MurG	83	- - AW RQARA I	MKAY KPD VVL	GMGGY VSG PG	GLAAWS LGIP	V VLHEQ - -	127
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	198	INTPS LTGKI	LY WV VDEF I	VQWQE L RDNY	L PRSKWF GIL	V GS	237
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	177	VSHL S LTGSL	LAPWLAD VFT	VHWR ALER AV	ARRRR RGT LV	Y VGSE TAR VT	226
<i>E. coli</i> MurG	127	- - - N GIA GL	TNKWLAKI AT	KVMQA FPG AF	PNAEV - - -	- VGN PVRT DV	167
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	- - -	- - -	- - -	- - -	- MG	2
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	227	DGA PHRL RSL	AAE QEA YALV	TVGSTK FSSL	VQAVVQ P GVC	ATL HQR FG IK	276
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	203	LALPLP PQ QRL	AGREG P VRL	VVGGS QGARI	LNQ TMP - - -	203	203
<i>E. coli</i> MurG	168	- - - IIEK ALF V	CGAT VPFP KKL	VS CVL SDEF	CQEL IQY GFV	RLII IQF GR NY	51
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	3	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	277	R LY V QH GTAE	VVAPP EAT LL	PALP MAA GAD	A SHPT TQQW S C	GGLL VEA F P Y	326
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	203	- - - - Q	VAA K LGDS V T	IWHQ SGK GSQ	QSVE QAY AEA	GQP QHKV T EF	244
<i>E. coli</i> MurG	52	SSEFE HL V QE	RGG QRE S QK I	PIDQ F GCG DT	AR QY V LM N -	GKL KV IGF DF	99
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	-	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	327	R P CLDA V IRG	- ATL V IT HAG	AGT ILE GL QA	Q RPL VV VP NR	Q - LMS DHQL	373
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	245	I DD MAA YAW	- ADVV V C RSG	ALT V SE I AAA	GLPA LF V FP Q	HKDR Q QY WNA	293
<i>E. coli</i> MurG	100	S T K M Q S I I RD	YSDLV I SHAG	TGSILD S LRL	NKPL I V CV ND	S - LMD NH QQ	147
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	-	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	374	D LAE A LANG G	F LFCV QVA E -	- LAER L P L LD	L TT LRPH G G -	M DAA QL Q E AL	420
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	294	L P LEK AGAA K	JIE QP QL S V D	AVANT L TAG WS	RET L LT MAER	ARA A S I P DAT	343
<i>E. coli</i> MurG	148	QIADKF VEL G	YVW S CAP T ET	GLIAGL RAS Q	TEKL KP FP VS	HNPS FER LL LV	197
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	-	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	421	R L V L TGHS AS	GERAKAD - - -	- - - - -	437		
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	344	ERV VANE V S RV	ARA - - - -	- - - - -	356		
<i>E. coli</i> MurG	198	ETI Y S	- - - -	- - - -	202		

Abbildung 14: Proteinalignment des *S. cerevisiae* Alg14p und Alg13p mit MurG aus *E. coli* Das homologe Protein aus dem Trypanosom *Leishmania major* (*L. major* Alg14-Alg13p) ist zur Verdeutlichung der homologen Bereiche zusätzlich abgebildet. Es wurde bei *S. cerevisiae* Alg14-Alg13p ²³⁸GS²³⁹ (rot) eingefügt und so die beiden Proteine fusioniert (blau). Das Startmethionin von Alg13p wurde gegen Alanin ausgetauscht. Das verkürzte Konstrukt (*S. cerevisiae* Alg14-151p) endet mit Aminosäure Alanin 151 X.

Die Untersuchungen der GlcNAc Transferaseaktivität des Fusionsproteins und der Funktion der löslichen Fraktion von Alg13p erfolgten in einem Hefestamm, bei dem sowohl *ALG13* als auch *ALG14* durch einen Galaktose induzierbaren Promotor (P_{GAL}) reguliert wird (vgl. 6.2.14). Die erfolgreiche Integration der Promotoren wurde einerseits über PCR Reaktionen mit Oligonukleotiden, die im integrierten Promotor und im *ALG13* bzw. *ALG14* Gen binden und andererseits über Wachstumsuntersuchungen überprüft. Wurden die Hefezellen in Glukosemedium angezogen (Gene reprimiert), war die Verdopplungszeit nach 16 h Inkubation

von 2 h auf 4 h angestiegen. Nach nochmaligem Überimpfen in Glukosemedium mit einer Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,002 oder Übertragung der Hefen auf Agarplatten mit Glukosemedium war kein Wachstum mehr festzustellen. So konnte anhand des Wachstumsphänotyps die Aktivität des Fusionskonstrukts überprüft werden.

2.5.1 *In vivo* Aktivität des Fusionskostrukts Alg14–Alg13p

Die funktionelle Analyse des Fusionsproteins Alg14p-Alg13p^{BIO} erfolgte zunächst *in vivo* durch den Glykosylierungsstatus der CPY. Dazu wurde der bereits erwähnte Hefestamm mit genomisch integrierten Galaktose induzierbaren Pomotoren vor *ALG13* und *ALG14* verwendet ($P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$). Bei der Repression der Gene durch Glukose war zu beachten, dass die Zelldichte der Hefezellen bei der Umsetzung in glukosehaltiges Medium ca. OD₆₀₀ 0,002 betrug. Wurden die Zellen bei höherer OD₆₀₀ (0,2) angeimpft, konnte teilweise nur geringe bis keine Repression der jeweiligen Gene beobachtet werden.

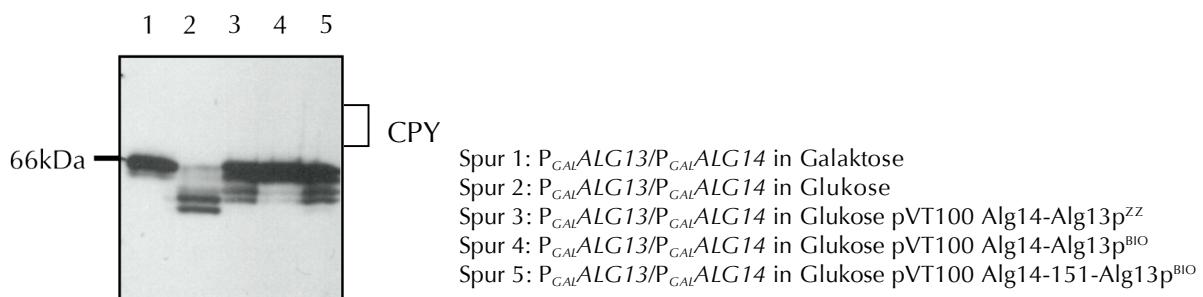


Abbildung 15: *In vivo* Aktivität der Fusionskonstrukte Alg14-Alg13. Die GNT Aktivität wurde durch Analyse des Glykosylierungssatus der CPY überprüft. Das Fusionsprotein mit beiden Volllängenproteinen war vollständig aktiv, wohingegen das im Alg14p um 86 Aminosäuren verkürzte Enzym weniger aktiv war (Alg14-151-Alg13p, Spur 5). Auch in diesem Fall war das Protein A epitopmarkierte Enzym weniger aktiv als Alg14-Alg13p^{BIO}.

Spur 1 in Abbildung 15 zeigt die vollständige Glykosylierung der CPY in Hefezellen, die in Galaktose angezogen wurden. Die Unterglykosylierung nach Repression der Gene ist in Spur 2 zu sehen. Im Vergleich dazu wiesen alle Fusionskonstrukte zumindest teilweise (Spur 3 und 5) bzw. vollständige Komplementation (Spur 4) auf.

Die Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY ergab, dass das Fusionskonstrukt aus Alg14p-Alg13p^{BIO} aktiv war. Die Unterglykosylierung des Protein A Fusionskonstruktes (Spur 3) war vergleichbar mit der wie sie bei der Expression des um 86 Aminosäuren verkürzten Fusionsproteins (Spur 5) auftrat. Da diese Proteine für die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* essentiell sind, konnte die Aktivität der Fusionskonstrukte durch einen Wachstumstest weiter untersucht werden.

Um die Repression der genomischen Kopie der Gene *ALG13* und *ALG14* sicherzustellen, erfolgte ein Zwischen-wachstum in Glukosemedium von acht Stunden. Anschließend wurde das

Wachstum auf Selektivplatten, die entweder Galaktose (zur Expression der genomisch codierten Gene), oder Glukose (zur Repression) enthielten, untersucht.

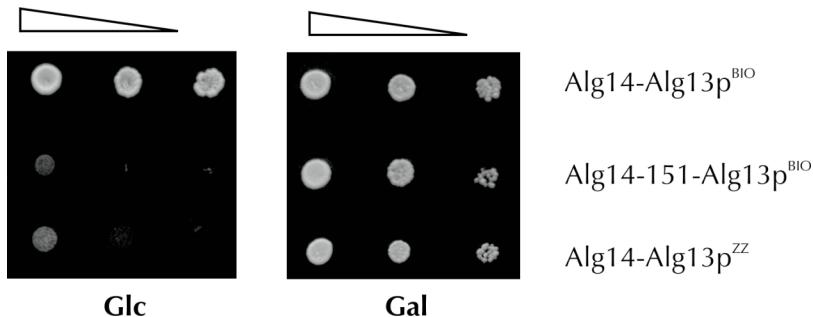


Abbildung 16: Tüpfeltest von $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ Hefezellen, die jeweils die gekennzeichneten Fusionskonstrukte exprimierten. Es wurden 3×10^4 , 3×10^3 und 3×10^2 Zellen auf die Agarplatten gebracht. Nur das Fusionskonstrukt aus beiden Proteinen mit der Biotinylierungssequenz war aktiv, da diese Zellen sowohl auf Glukosemedium als auch auf Galaktosemedium wachsen konnten. Die beiden anderen Konstrukte, Alg14-Alg13^{ZZ} bzw. Alg14-151-Alg13^{BIO}, erlaubten kein Wachstum auf Glukosemedium.

Die in Abbildung 16 dargestellte Wachstumsanalyse zeigte, dass ausschließlich das Fusionsenzym aus Alg14-Alg13p mit der Biotinylierungsdomäne vollständig aktiv war. Das Protein A Fusionskonstrukt und das verkürzte Alg14-151 Konstrukt waren nicht aktiv. Auch wenn die Analyse des Glykoproteins CPY eine teilweise Komplementation dieser Konstrukte zeigte, reicht diese Restaktivität offensichtlich *in vivo* nicht für die Lebensfähigkeit der Zellen aus.

2.5.2 Die cytosolische Fraktion von Alg13p ist für das Wachstum von *S. cerevisiae* nicht essentiell.

Durch die Fusion von Alg14-Alg13p konnte eine aktive GlcNAc Transferase generiert werden und dadurch der Wachstumsdefekt, ausgelöst durch die Repression von *ALG13* und *ALG14*, vollständig kompensiert werden. Ein zweiter Aspekt, der mit Hilfe dieses Fusionskonstruktks geklärt werden konnte, ist die Funktion der cytosolischen Fraktion von Alg13p. Im Hefestamm $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ kann die Expression der genomischen Kopie der Gene *ALG13* und *ALG14* inhibiert, durch die Anwesenheit des plasmidcodierten Alg14-Alg13p^{BIO} Fusionskonstruktks die Funktionalität der GNT garantiert und gleichzeitig die Existenz des löslichen Alg13p verhindert werden. So wurde die funktionelle Untersuchung der Funktion dieser nicht membrangebundenen Fraktion bei Wachstum in glukosehaltigem Medium ermöglicht. Wäre die cytosolische Form – wie es für die membrangebundene Form zutrifft – essentiell für das Wachstum der Hefezellen, sollte ein verminderter Wachstum auftreten, wenn lösliches Alg13p fehlt. Um die Untersuchung des plasmidcodierten Fusionskonstruktks zu ermöglichen, erfolgte die Repression der genomisch codierten Gene *ALG13* und *ALG14* für 16 h. Die so vorinkubierte Kultur wurde auf OD₆₀₀ 0,2 verdünnt und das Wachstum der Zellen anschließend über insgesamt 8 h verfolgt.

Wachstumstest des Hefestamms $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$

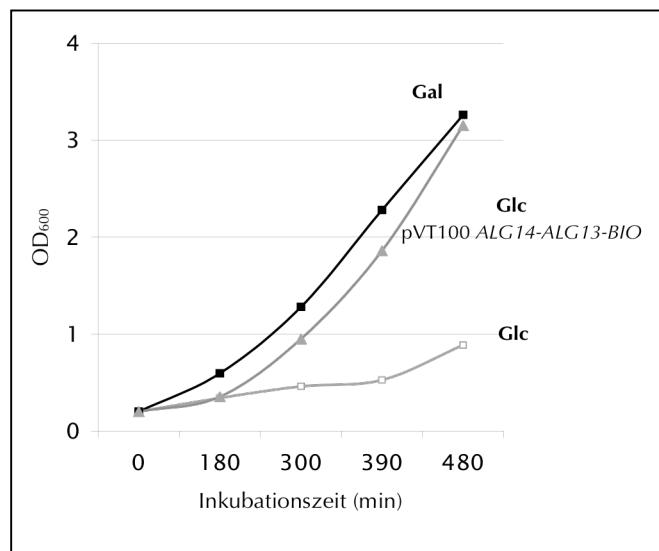


Abbildung 17: Wachstumsanalyse des Hefestamms $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ mit und ohne Fusionskonstrukt $ALG14$ - $ALG13$ - BIO . Nach Vorinkubation der Zellen von 16 h in Glukosemedium wurden die Zellen auf OD_{600} 0,2 in entsprechendem Medium verdünnt und das Wachstum über 8 h verfolgt. Zellen, welche die GlcNAc-Transferase genomisch (Gal) oder plasmidcodiert exprimierten (pVT100 $ALG14$ - $ALG13$ - BIO), hatten eine Verdopplungszeit von ca. 2 h. Zellen, bei denen beide Gene reprimiert waren, hatten dagegen eine Verdopplungszeit von ca. 4 h.

Die in Abbildung 17 dargestellte Wachstumsanalyse des Hefestamms $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ zeigte, dass das plasmidcodierte Fusionsprotein den Wachstumsphänotyp vollständig komplementierte, da sich die Zellen, die das Fusionskonstrukt exprimierten, mit der gleichen Verdopplungszeit teilten wie Hefezellen mit genomisch codierter GlcNAc-Transferase. Auch nach mehrmaligem Überimpfen in neues Glukosemedium konnte keine Verschlechterung des Wachstums dieser Hefezellen festgestellt werden, wodurch eine essentielle Funktion der cytosolischen Fraktion augeschlossen werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Die einzige essentielle Funktion von Alg13p liegt somit in der membrangebundenen Form in Verbindung mit Alg14p.

2.6 Untersuchungen von Alg13p in Bezug auf die GNT Aktivität und Interaktion mit Alg14p

Das folgende Kapitel beschäftigt sich vorwiegend mit der löslichen Form von Alg13p. In Abbildung 11 ist die physikalische Interaktion von Alg13p mit Alg14p nachgewiesen. Das Interesse der folgenden Versuche liegt hauptsächlich in der genaueren Analyse der Funktion der löslichen Fraktion von Alg13p sowie dem Auffinden essentieller Aminosäuren innerhalb des Alg13 Proteins.

2.6.1 Die cytosolische Fraktion von Alg13p

Die vorausgegangenen Experimente zeigten, dass Alg13 und Alg14 für die Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂ *in vivo* und *in vitro* nötig sind. Jeweils ein Protein alleine konnte die Übertragung eines N-Acetylglucosaminrests nicht katalysieren. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Alg13p trotz fehlender Transmembranspanne sehr stark mit der Membran interagiert und auch mit 2 % Detergenz nur etwa zu 50 % aus der Membran herausgelöst werden kann (Abb. 4).

Da außerdem 50 % von Alg13p nicht an die Membran gebunden sind, stellt sich die Frage, ob bestimmte Faktoren existieren, durch die sich die cytosolische und membrangebundene Fraktion von Alg13p unterscheiden. Eine Möglichkeit dabei ist eine Phosphorylierung des löslichen Alg13p, das dann über einen unbekannten Mechanismus an die Membran bindet oder der umgekehrte Fall, dass eine Phosphorylierung die Interaktion mit Alg14p verhindert. Dies wurde an einem Alg13p^{myc} Immunpräzipitat mittels *Western Blot* und einem anti-Serin/Threoninphosphat Antikörper untersucht. Als Kontrolle diente das gleiche Immunpräzipitat, das aber im *Western Blot* mit einem anti c-myc Antikörper detektiert wurde. Da aber kein übereinstimmendes Signal nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass Alg13p nicht durch Phosphorylierung modifiziert wird (Daten nicht gezeigt). Durch die im Folgenden beschriebene Generierung einer aktiven GlcNAc Transferase aus Kombinationen von cytosolischem Alg13p bzw. in *E. coli* heterolog exprimiertem Alg13p mit Alg14p aus *S. cerevisiae* ist die Annahme am wahrscheinlichsten, dass keine spezielle Proteinmodifikation von Alg13p verantwortlich ist, Alg13p an Alg14p und damit an die Membran zu rekrutieren.

2.6.1.1 Generierung der GNT Aktivität mittels cytosolischem Alg13p

Die in Abbildung 12 dargestellten Analysen der cytosolischen Fraktion von Alg13p wurden durch verschiedene Kombinationen von Alg13p mit Alg14p detaillierter untersucht. Vorversuche mit ungereinigtem cytosolischem Extrakt aus *S. cerevisiae* zeigten, dass größere Volumina an cytosolischer Fraktion den GNT Test inhibierten, so dass unter Standardbedingungen (vgl. 6.3.10) sowohl mit Membranen als auch mit einem daraus gewonnenem Solubilisat kaum Verlängerung von Dol-PP-GlcNAc₁ zu Dol-PP-GlcNAc₂ zu beobachten war. Deshalb wurde im Versuch zur Analyse der cytosolischen Fraktion von Alg13p diese auf ca. 13 % des Gesamtansatzes reduziert, da unter diesen Bedingungen im Mikrosomensolubilisat aus Wildtyphefzellen vollständige Verlängerung zu Dol-PP-GlcNAc₂ erfolgte (Abb. 18 Spur 3).

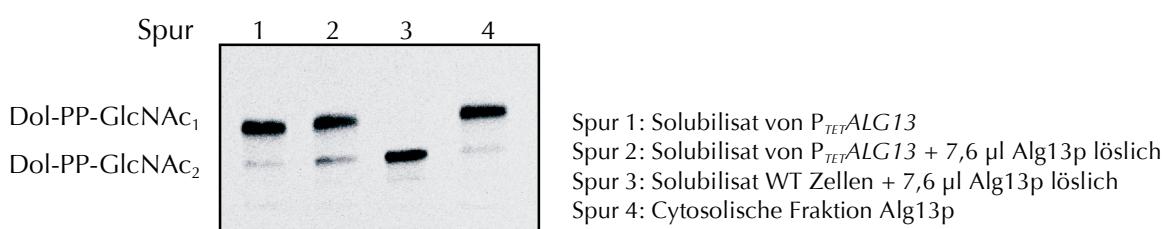


Abbildung 18: Analyse der Glykolipidfraktion aus einem *in vitro* GNT Test mit $P_{TET}ALG13$ Zellen. Zur Generierung einer aktiven GNT wurde das Solubilisat aus $P_{TET}ALG13$ Zellen mit cytosolisch lokalisiertem Alg13p komplementiert. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Durch Zugabe von löslichem Alg13p konnte die GNT Aktivität leicht gesteigert werden. Die Trennung der Zuckerlipide erfolgte mit Dünnschichtchromatographie.

In Abbildung 18, Spur 1 ist die GNT Aktivität im Mikrosomensolubilisat von $P_{TET}ALG13$ Zellen, die *ALG13* für 24 h reprimierten, dargestellt. Spur 2 zeigt die Aktivität im gleichen Solubilisat, das mit cytosolischer Fraktion von Alg13p komplementiert wurde. Die vollständige Verlängerung zu Dol-PP-GlcNAc₂ in einem Solubilisat aus Membranen, die sowohl Alg13p als auch Alg14p enthielten und zu der die gleiche Menge an cytosolischer Fraktion gegeben wurde, ist in Spur 3 dargestellt. Spur 4 zeigt die GNT Aktivität der cytosolischen Fraktion ohne Zugabe von Alg14p.

Wurden die in den jeweiligen Fraktionen lipidgebundenen Saccharide mit der OptiQuant Software quantifiziert, ist der Anteil an Dol-PP-GlcNAc₂ in der ersten Spur 3,9 % und 3,1 % in Spur 4. In der zweiten Spur, die den Umsatz von cytosolischem Alg13p und Alg14p im Mikrosomensolubilisat anzeigt, konnten 14,0 % Dol-PP-GlcNAc₂ detektiert werden. Der Umsatz von Dol-PP-GlcNAc₁ zu Dol-PP-GlcNAc₂ konnte also durch Zugabe der löslichen Fraktion von Alg13p um den Faktor 3,6 gesteigert werden. Durch heterologe Expression von Alg13p in *E. coli* wurde versucht, einerseits die inhibitorischen Faktoren des aus *S. cerevisiae* gewonnenen Isolats zu eliminieren, andererseits Alg13p in größerer Menge zu isolieren.

2.6.1.2 Heterologe Expression von *ALG13* in *E. coli*

Die DNA Sequenz von *ALG13* wurde mit *FseI/Ascl* in den *E. coli* Expressionsvektor pET28-His₁₀F/A kloniert. In Vorversuchen wurden die Wasch- und Elutionsbedingungen ermittelt und über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung des Gels die Reinheit des Eluats überprüft (Abb. 19). Dabei zeigte sich, dass nach dem Zellaufschluss nur ein geringer Teil von Alg13p tatsächlich in löslicher Form vorlag. Der größte Teil war, vermutlich in sogenannten *inclusion bodies*, in nicht-löslicher Form im Zellpellet zu finden. Auch andere Expressionsbedingungen (z.B. Expression bei 20° C) führten nicht zu größeren Mengen an löslichem Alg13p.

Es wurden 400 ml BL21(DE3) Zellen mit dem Vektor pET28 *ALG13-HIS₁₀* bei OD₆₀₀ 0,5 mit 400 µM IPTG induziert und für vier Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden mit *French Press* aufgeschlossen, der gereinigte Überstand auf eine Ni-NTA Säule (Peplab) gegeben und durch insgesamt sechs Waschschritte aufgereinigt (vgl. 6.3.11). Die Elution erfolgte in vier Stufen bei der die Imidazolkonzentration von 100 mM über 150 mM und 200 mM bis zu 250 mM gesteigert wurde. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert und sowohl einer Coomassiefärbung als auch einer Silberfärbung unterzogen.

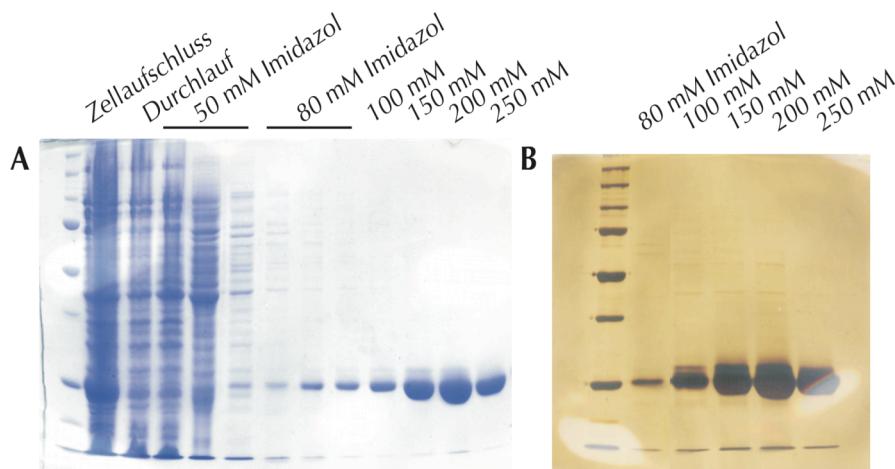


Abbildung 19: Coomassie- (A) und Silberfärbung (B) der Aufreinigung von Alg13p^{His}. Die Eluatfraktionen wurden mit Coomassie (A) und zusätzlich mit der empfindlicheren Silberfärbung (B) analysiert. In beiden Fällen konnte mit 250 mM Imidazol noch Protein von der Säule eluiert werden. Die Silberfärbung (B) zeigt, dass in der letzten Waschfraktion mit 80 mM Imidazol nur noch Spuren von Verunreinigungen vorhanden waren.

Auch die sehr empfindliche Silberfärbung der Eluatfraktionen in Abbildung 19 B zeigte kaum Verunreinigungen mit anderen Proteinen. Deshalb konnte auf diese Weise gereinigtes Alg13p in verschiedenen, unten beschriebenen Kombinationen in einen GNT Test eingesetzt werden.

Um eine bestmögliche Interaktion von *E. coli* exprimiertem und gereinigtem Alg13p mit in *S. cerevisiae* exprimiertem Alg14p zu gewährleisten, wurden in diesen Untersuchungen Hefezellen verwendet, die *ALG13* reprimierten ($P_{TET}ALG13$) und Alg14p überexprimierten. Dabei wurde festgestellt, dass bei Überexpression von Alg14p die Repression von Alg13p weniger

effizient war, so dass in diesem Fall *ALG13* für 55 h reprimiert wurde. Die Repression erfolgte in diesem Fall nicht mit Tetracyclin, sondern dessen wasserlöslichen und stabileren Analog Doxyzyklin.

Prinzipiell wurden drei Kombinationen getestet. Im ersten Experiment wurde Alg13p^{His} über Ni-NTA Agarose gereinigt und anschließend mit Alg14p inkubiert. Im zweiten Fall wurde Alg13p^{His} aus *E. coli* mit Alg14p aus *S. cerevisiae* inkubiert und im Anschluss Alg13p^{His} gereinigt. In der dritten Variante wurde auf eine Aufreinigung des Ansatzes ganz verzichtet. Die unterschiedlichen Inkubationen wurden vorgenommen, da aus den Versuchen mit cytosolischem Alg13p aus *S. cerevisiae* bekannt war, dass die GNT Reaktion durch Bestandteile des Cytosols inhibiert wurde. Durch die vorherige Aufreinigung von Alg13p^{His} sollten diese Bestandteile entfernt werden (Abb. 20 Spur 1). Im zweiten Fall wurde angenommen, dass lösliches, noch nicht an die Matrix gebundenes Alg13p eventuell besser mit Alg14p interagiert und so leichter eine aktive GlcNAc Transferase generiert werden kann (Abb. 20 Spur 2). Die GNT Aktivität der jeweiligen Isolate ist in Abbildung 20 dargestellt.

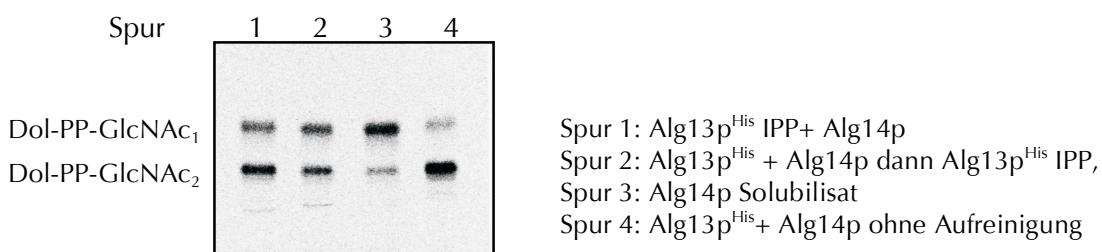


Abbildung 20: Analyse der Glykolipidfraktion aus einem *in vitro* GNT Test mit heterolog exprimiertem Alg13p^{His} und Alg14p. In allen Fällen wurde Alg14p aus Hefezellen gewonnen die *ALG13* reprimierten und *ALG14* überexprimierten. Die Spuren 1 und 2 zeigen, dass durch Zugabe von Alg13p^{His} die GNT Aktivität gesteigert werden konnte. Spur 4 verdeutlicht, dass auch mit ungereinigtem Alg13p^{His} ein aktives Enzym generiert werden konnte, wohingegen im Solubilisat, das nur Alg14 enthielt, kaum Dol-PP-GlcNAc₂ synthetisiert wurde. Die Glykolipide wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt.

Die Ergebnisse des GNT Tests zeigen deutlich, dass in *E. coli* heterolog exprimiertes Alg13p mit Alg14p interagieren kann und eine aktive GlcNAc Transferase bildet, unabhängig davon, ob der Ansatz vor oder nach der Interaktion aufgereinigt wurde (Abb. 20 Spur 1 und 2). Der Versuchsanstz ohne Aufreinigung zeigte dabei die höchste GNT Aktivität (Abb. 20 Spur 4).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es vermutlich keiner speziellen Modifikation von Alg13p bedarf, um mit Alg14p eine aktive GlcNAc Transferase zu bilden. Eventuell ist die alleinige Bindung des Substrats UDP-GlcNAc ausreichend, um die Interaktion beider Proteine zu ermöglichen. Um diese Hypothese zu belegen, sollte nachgewiesen werden, dass die UDP-GlcNAc Bindung tatsächlich von Alg13p vermittelt wird.

2.6.2 Untersuchung der UDP-GlcNAc Bindungsstellen im Alg13 Protein

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich die Mitglieder der Glycosyltransferase Familie B durch ein glycinreiches Sequenzmotiv aus, von dem angenommen wird, dass es eine Konformation begünstigt, welche die Bindung von nukleotidaktivierten Zuckern ermöglicht. Die im MurG Protein für die UDP-GlcNAc Bindung verantwortlichen Aminosäuren befinden sich in dem Bereich des Proteins, der Homologie zu Alg13p aufweist (Abb. 21).

Durch Austausch von hoch konservierten Aminosäuren und Aminosäuren, die an der UDP-GlcNAc Bindung beteiligt sein könnten, sollte der Frage nachgegangen werden, ob gleiche oder ähnliche Aminosäuren wie im MurG auch im Alg13p die Substratbindung vermitteln. Des weiteren wurden Aminosäuren, die innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert sind, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Enzymaktivität untersucht. In Abbildung 21 sind die jeweiligen Aminosäuren anhand eines Proteinalignments gekennzeichnet.

<i>S. cerevisiae Alg14</i>	1	MK TAY LAS SLV	LIV STAYVIR	LIA I LPFFHT	QAG TEKD TKD	GVNL LKIRKS	50
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	1	- - - MWF LIA	LLL GCA FLAS	LWHS V VR Y VP	- - - - -	- - - LAIRSP	32
<i>E. coli MurG</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - MMS	3
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	51	S KKP LKIF VF	LGS GGHT GEM	I RLL ENY - Q	D LL LGKS IIVY	LGYS D EA SRQ	98
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	33	HRCAM KI GV V	LGS GGHT SEM	LRAITEIPLS	YWLD TRPF YV	VSA TDP HSAS	82
<i>E. coli MurG</i>	4	GQG KRL MV MA	GGT GGH FPG	LAVAHHL	- MAQ GWQ VRW	LGT ADR MEAD	49
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	99	RFA AHF I KKFG	HCKVK YY E FM	KAREVKA TLL	QSVKTI I GTL	VQS FV HV VR I	148
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	83	LAIS QLE EQQR F	ERRV VV Y T P	RAREVG QSYL	MSII ITT IR	- - - AT LAC F	126
<i>E. coli MurG</i>	50	LVPK HG	- - - IEID FIRIS	GLRGKG IKAL	IAAP LR IFN	- - - - -	83
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	149	RFAM CG SP HL	FLL NGPG TCC	- IISFWLKIM	E L L L P L L LGSS	HIVY VES LAR	197
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	127	RFPCT E KPDV	LL TN GP GVCV	PVI A AA AV CVA	SCAP WY GRP	A IV YM ES F TC	176
<i>E. coli MurG</i>	83	- - AWR QARA I	MKAY KPDV VL	GMGGY VSG PG	GLAA WSL GIP	V VL HEQ	127
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	198	INTPS LTGKI	LY - W V D E F I	VQWQE L RD NY	L PR SKW F G IL	V	237
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	177	VSH L S LTGSL	LAPWL ADVFT	VHW RA L ERA V	ARR RR RG T LV	Y VG SE TAR V T	226
<i>E. coli MurG</i>	127	- - - N G I A GL	TNKWL AKIAT	KVMQA F P GAE	PNAEV	- VGN P V RT DV	167
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - MG	2
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	227	DGAPH RL RSL	AAE QEA Y ALV	T VG S T K F S S L	V Q A V V Q P G V C	A TL H QR FG I K	276
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	203	LALPL P Q Q R L	AGRE GP V R VL	V VGG S Q G ARI	L N Q T M P	- - - - -	203
<i>E. coli MurG</i>	52	SSEF EH L V QE	RGG Q R E S Q K I	P I D Q F G C G D T	AR Q Y V L MN	GKL KV I G F DF	99
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	277	R LY V Q HG TAE	V V A P P E A T LL	P AL P M A A G A D	A SH P T Q Q W S C	GGL L V E A F PY	326
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	245	- - - - - Q	VAA K L G D S V T	I W H Q S G K G S Q	Q S V E Q A Y A E A	GQP Q HK V T E F	244
<i>E. coli MurG</i>	100	S T K M Q S I I RD	YSDLV I SHAG	T G S I L D S L R L	AR Q Y V L MN	- - - - -	99
<i>S. cerevisiae Alg13</i>	327	R P C LD A V I R G	- ATLV I THAG	AGT I LE GL Q A	Q R P L V V V P N R	Q - - L M S D H Q L	373
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	294	I D D M A A A Y A W	- ADVV V V C R S G	ALT V S E I A A A	GLP AL F V P F Q	HK D R Q Q Y W N A	293
<i>E. coli MurG</i>	148	Q I A D K F V E L G	Y V W S C A P I T E T	T G S I L D S L R L	N K P L I V C V N D	S - - L M D N H Q Q	147
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	374	D LAEA A LANG	F L F C V Q V A E	- LA E R L P L L D	L T T L R P H G G	M DAA Q L Q E A L	420
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	344	L P L E K A G A A K	I I E Q P Q L S V D	AVANT LAG WS	RET L L T M A E R	ARA A S I P D A T	343
<i>E. coli MurG</i>	198	Q I A D K F V E L G	Y V W S C A P I T E T	GLI A GL R AS Q	TEK L K P F P V S	H N P S F E R L L V	197
<i>S. cerevisiae Alg14</i>	421	R L V L T GHSAS	GERAKAD	- - - - -	- - - - -	437	
<i>L. major Alg14-Alg13</i>	344	ER V A N E V S R V	ARA	- - - - -	- - - - -	356	
<i>E. coli MurG</i>	198	E T I Y S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	202	

- ↗ Aminosäuren die gegen Alanin ausgetauscht wurden
- ♦ Aminosäuren die im MurG Protein an der UDP-GlcNAc Bindung beteiligt sind [90]
- ✳ Aminosäuren die im MurG Protein laut einer früheren Publikation an der UDP-GlcNAc Bindung beteiligt sind [89]

Abbildung 21: Proteinalignment von *E. coli MurG*, *S. cerevisiae Alg13* und *S. cerevisiae Alg14*. Zur Verdeutlichung der homologen Bereiche ist zusätzlich das Homolog Alg14-Alg13 aus *Leishmania major* abgebildet. Die ausgetauschten Aminosäuren sind durch Pfeile gekennzeichnet. Im MurG Protein an der UDP-GlcNAc Bindung beteiligte Aminosäuren sind durch Sterne markiert.

Es wurden einerseits Aminosäuren, die zwischen Hefe bis Mensch hoch konserviert sind (Nr. 75, Nr. 117, Nr. 131, Nr. 146; vgl. Abb. 21 und 23), andererseits die Aminosäure Nr. 125, die an der Substratbindung beteiligt sein könnte, gezielt gegen Alanin ausgetauscht und die mutierten Alg13 Proteine hinsichtlich ihrer Enzymaktivität und Interaktionsfähigkeit mit Alg14p untersucht. Dazu wurde ein Hefestamm verwendet, der den Tetracyclin reprimierbaren Promotor vor *ALG13* und das C-terminale c-myc Epitop an *ALG13* fusioniert hat ($P_{TET}ALG13\text{-myc}$). Die jeweiligen mutierten Alg13p Varianten wurden auf den Plasmiden pVT100 (*ALG13* 125D/A) bzw. YCplac33 (alle übrigen Mutationen) exprimiert. Der Vektor pVT100 enthält das 2μ Element, wohingegen YCplac33 ein Centromerplasmid ist. Mutationen die keine Auswirkung auf die Funktionalität von Alg13p hatten wurden zusätzlich in das Centromerplasmid umkloniert, um auszuschließen, dass eine starke Überexpression des mutierten Gens eventuell den zu beobachtenden Phänotyp kompensiert. Die Aktivität der mutierten Enzyme ist in Abb. 22 dargestellt.

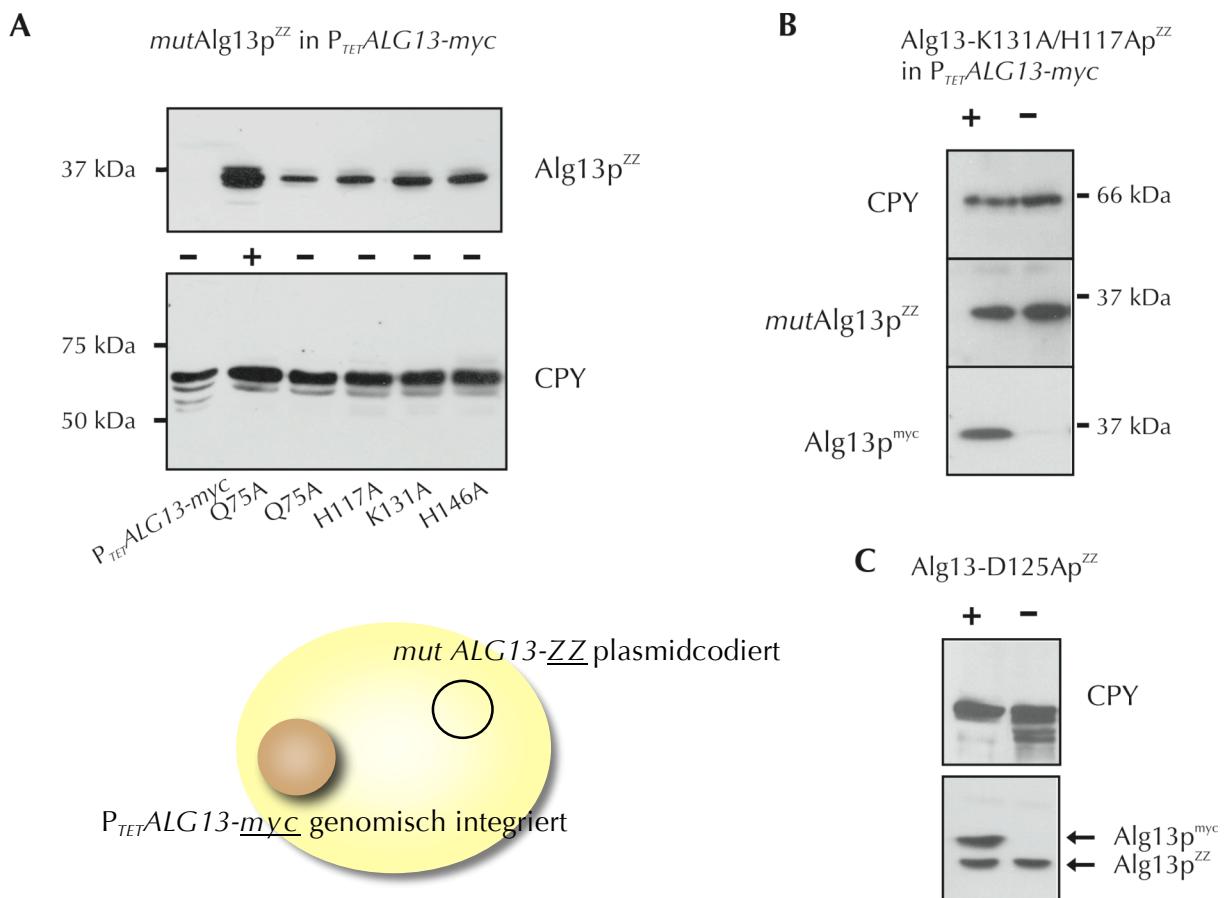


Abbildung 22: Zielgerichtete Mutationen im *S. cerevisiae ALG13* Gen. Das „+“ Zeichen zeigt die Expression des genomisch codierten *ALG13*-myc, das „-“ Zeichen dessen Repression. Die epitopmarkierten Alg13p Konstrukte wurden jeweils in der Membranfraktion detektiert. Die Aktivität der veränderten *ALG13* Genprodukte wurde *in vivo* durch den Glykosylierungsstatus der CPY verfolgt. Die Aminosäuren Nr. 75, 117, 131 und 146 hatten *in vivo* keinen Effekt auf die Aktivität der GNT (A). Auch ein gekoppelter Austausch der AS Nr. 117 und 131 führt nicht zu einem inaktiven Alg13p (B). Lediglich Aspartat Nr. 125 hatte einen Einfluß auf die Glykosylierung der CPY (C).

In Abbildung 22 A sind Varianten von *ALG13* dargestellt, die nicht zu einer reduzierten Aktivität der GNT führten. Die ausgetauschten Aminosäuren sind jeweils durch Zahlen gekennzeichnet. Als Kontrolle dienten Hefezellen, bei denen *ALG13* für 24 h reprimiert war (Spur 1). Sowohl die Expression als auch die Membranlokalisierung der mutierten Varianten von Alg13p wurden in einem anti-ZZ dekorierten Western Blot überprüft (Abb. 22, alle *mutAlg13p^{ZZ}* Signale). Auch der zweifache Austausch der Aminosäuren H117A und K131A führte nicht zu einer geringeren Enzymaktivität (Abb. 22 B). Nur der Austausch der AS Nr. D125A bewirkte in *S. cerevisiae* ein inaktives Protein (Abb. 22 C). Die Inaktivität von Alg13-D125Ap beruht nicht auf einer fehlenden Interaktion mit Alg14p, da alle *mutAlg13p* Varianten in der Membranfraktion zu finden waren.

2.6.3 Homologe Alg13 Proteine aus anderen Organismen

Homologe Proteine zu Alg13 aus *Schizosaccharomyces pombe* und Mensch besitzen sowohl hinsichtlich der Aminosäuresequenz als auch des Hydropathieplots große Ähnlichkeit (Abb. 23). Deshalb wurde die GNT Aktivität und Interaktion mit *S. cerevisiae* Alg14p dieser Proteine näher untersucht (Abb. 24).

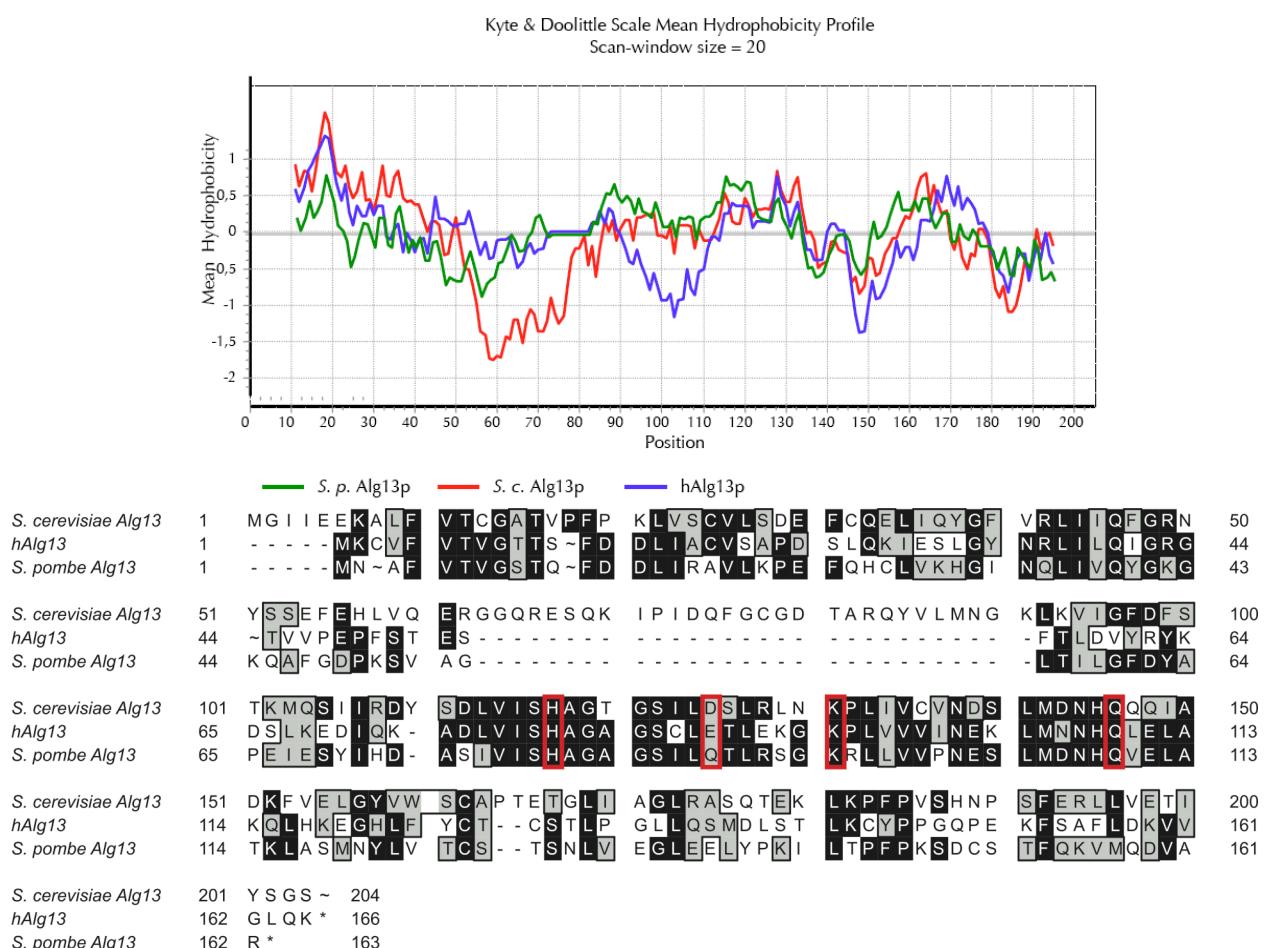


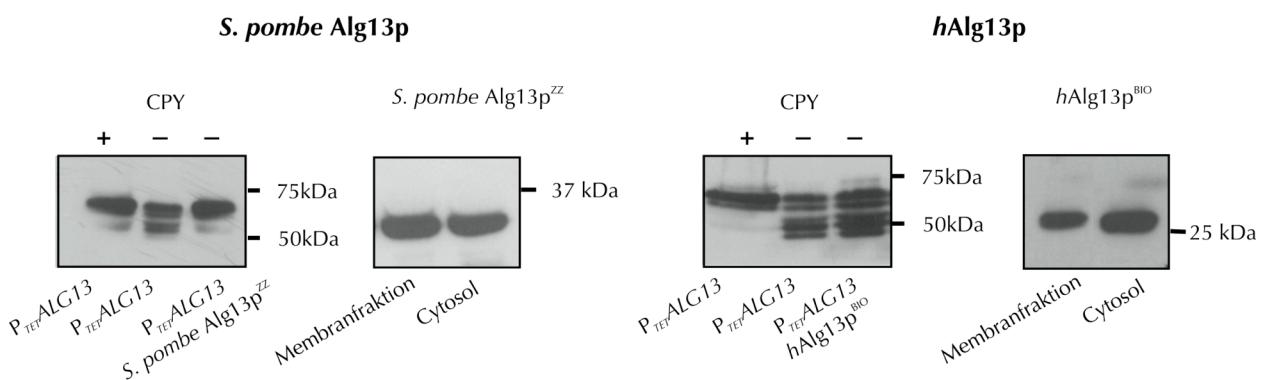
Abbildung 23: Hydropathieplot und Proteinsequenzalignment der Alg13 Proteine aus *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *H. sapiens*. Die hoch konservierten Aminosäuren, die gegen Alanin ausgetauscht wurden, sind rot markiert (Abb. 22).

Die jeweiligen DNA Sequenzen wurden mit PCR amplifiziert und in den Vektor pVT100 mit dem Protein A Epitop im Fall von *S. pombe* Alg13p und dem BIO Epitop im Fall des humanen Homologs kloniert. Die Funktionalität der Proteine wurde zunächst *in vivo* durch Analyse der CPY, das humane Homolog auch durch einen *in vitro* GNT Test, überprüft (Abb. 24).

Das Alg13p Homolog aus *S. pombe* war in *S. cerevisiae* funktionell und bildete mit *S. cerevisiae* Alg14p eine aktive GlcNAc Transferase (Abb. 24 A).

Die Überexpression des humanen Alg13p zeigte keine Komplementation des Hefegens, konnte aber in der Membranfraktion detektiert werden (Abb. 24 A). Das bedeutet, dass *hAlg13p* zwar mit *S. cerevisiae* Alg14p interagieren kann, was aber dennoch nicht zu einem aktiven Enzym führt. Unter der Annahme, dass in einem *in vitro* Test die Substrate Dol-PP-GlcNAc₁ und UDP-GlcNAc in großem Überschuss angeboten werden, und eventuell die Interaktion der beiden Proteine in einem Detergensolubilisat stabilisiert ist, wurde ein *in vitro* GNT Test im Mikrosomensolubilisat aus Zellen durchgeführt, die das *S. cerevisiae* Alg13p reprimierten und das humane Homolog überexprimierten ($P_{TET}ALG13$ pVT100 *hAlg13-BIO*). Dieser Test zeigte eindeutig, dass *hAlg13p* in Hefe das homologe Enzym nicht ersetzen kann (Abb. 24 B).

A In vivo Analyse von Alg13p Homologen



B In vitro GNT Aktivität des humanen Alg13p Homologs

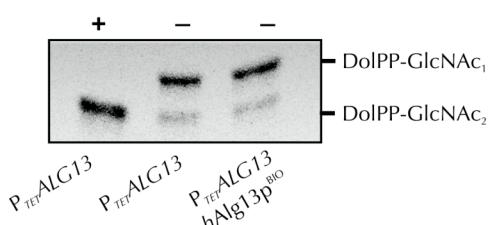


Abbildung 24: In vivo und in vitro Aktivität von ALG13 Homologen aus *S. pombe* und Mensch. Das Gen aus der Spalthefe *S. pombe* komplementiert das Fehlen des *S. cerevisiae* Gens vollständig, wohingegen das humane Alg13p *in vivo* und *in vitro* keine GNT Aktivität zeigt. „+“ steht für die Expression der genomischen Kopie von *ALG13*, „-“ für die Repression.

Aufgrund dieser Befunde wurde in einem weiteren Ansatz der entgegengesetzte Fall getestet, in dem die Interaktion des *hAlg14* Proteins mit *S. cerevisiae* Alg13p analysiert wurde. Auch für das Alg14 Homolog sind große Ähnlichkeiten zum *S. cerevisiae* Alg14 Protein sowohl hinsichtlich der Sequenz als auch im Hydropathieplot festzustellen (vgl. Abb. 26).

Zum einen wurde die enzymatische Aktivität von *hAlg14p* *in vivo* durch Analyse des Glykoproteins CPY untersucht (Abb. 25 A). Andererseits wurde die Interaktionsfähigkeit von *hAlg14p* mit *S. cerevisiae* Alg13p durch Immunpräzipitation des *hAlg14p^{ZZ}* Proteins analog zu den Versuchen mit den Hefeproteinen analysiert (vgl. Abb. 8, Abb. 25 B). Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte in diesem Versuch nicht durch einen pH Sprung, sondern durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer.

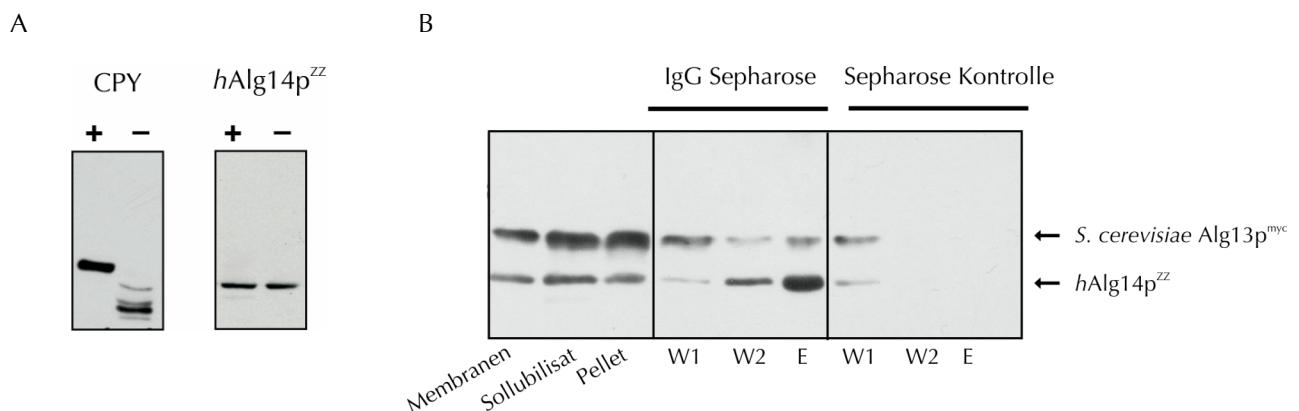


Abbildung 25: *In vivo* Aktivität von *hAlg14p* und Interaktion mit *S. cerevisiae* Alg13p. Das humane Homolog zu Alg14p ist *in vivo* nicht aktiv (A). Die Expression des genomisch codierten *ALG14* Gens ist mit „+“ gekennzeichnet, die Repression mit „-“. Die Interaktion wurde durch Aufreinigung von *hAlg14p^{ZZ}* mittels einer IgG Sepharosematrix analysiert (B). Auch in diesem Fall war *S. cerevisiae* Alg13p C-terminal mit dem c-myc Epitop markiert und *hAlg14p^{ZZ}* wurde auf dem Plasmid pVT100 überexprimiert. In der Eluatfraktion war nur ein sehr schwaches Signal von Alg13p^{myc} detektierbar (B). Die Kontrolle mit Sepharosematrix zeigte kein gebundenes Protein. W1 und W2 sind Waschfraktionen, E die Eluatfraktion.

Der *Western Blot* aus Abbildung 25 B zeigt deutlich, dass das Hefe Alg13p^{myc} nicht mit dem humanen Alg14p^{ZZ} interagiert. Das Alg13p^{myc} Signal nimmt ab und zeigt im Eluat kein Maximum. Die fehlende Interaktion scheint auch die Erklärung dafür zu sein, dass in Hefe exprimierte *hAlg14p* nicht aktiv ist.

Bezüglich der humanen Homologe von Alg13p/Alg14p kann also festgehalten werden, dass die einzelnen Proteine mit den *S. cerevisiae* Proteinen kein aktives Enzym bilden können. Das *hAlg13* Homolog kann zwar mit *S. cerevisiae* Alg14 interagieren (Abb. 24 A), nicht aber das *hAlg14* mit *S. cerevisiae* Alg13p (Abb. 25 B). Dies ist übereinstimmend mit den Befunden von Gao X et al. [91], dass eine Co-Expression beider humaner Homologe eine aktive Transferase generiert, wohingegen mit den einzelnen Proteinen *hAlg13p* bzw. *hAlg14p* in *S. cerevisiae* keine Enzymaktivität meßbar ist.

2.7 Topologie und essentielle Aminosäuren von Alg14p

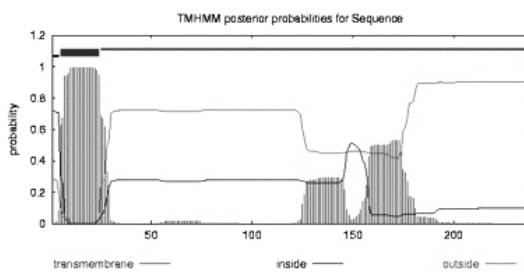
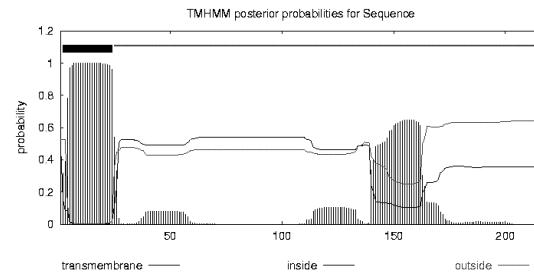
2.7.1 Alg14p ist ein Membranprotein mit einer Transmembranspanne

Das Alg14 Protein wurde mit verschiedenen Vorhersageprogrammen hinsichtlich hydrophober Bereiche untersucht. Alle Vorhersagen gehen von einem Membranprotein aus, das im ER lokalisiert ist, und zwischen zwei und drei Transmembranspannen besitzt. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Aufklärung der Membrantopologie von Alg14p.

Der in Abbildung 26 A dargestellte Hydropathieplot zeigt insgesamt 3 hydrophobe Bereiche. Der N-Terminus kann sowohl im ER als auch cytoplasmatisch lokalisiert sein. So gibt es insgesamt sechs verschiedene Möglichkeiten für die Topologie dieses Proteins. Es können alle drei hydrophoben Domänen oder nur zwei bis hin zu nur einer Transmembranspanne auftreten. Eine Möglichkeit zeigt Abbildung 26 B, wobei alle drei hydrophoben Bereiche als Transmembranspannen genutzt werden.

Das Homolog von Alg14p aus *H. sapiens* ist in Hefe nicht aktiv, obwohl sowohl hinsichtlich der Aminosäuresequenz (31 %) als auch des Hydropathieplots große Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen besteht (Abb. 26). Jedoch findet, wie in Abbildung 25 B gezeigt, zwischen *S. cerevisiae* Alg13p und hAlg14p nur schwache Interaktion statt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass hAlg14p, trotz aller Ähnlichkeit, eine unterschiedliche Membrantopologie besitzt. Infolgedessen wurde auch das humane Homolog mit dem Bio-Epitop fusioniert und eine Topologiestudie analog zu *S. cerevisiae* Alg14p durchgeführt. Die zweite hydrophobe Domäne ist hier allerdings so schwach ausgeprägt, dass sie in Vorhersageprogrammen nicht als potentielle Transmembranspanne aufgeführt wird und deshalb mit dem kürzesten Fragment kein Fusionsprotein angefertigt wurde (Abb. 26 A, B)

A

S. cerevisiae Alg14p*hAlg14p*

ALG14-237

| BIO

ALG14-151

| BIO

ALG14-117

ALG14-216

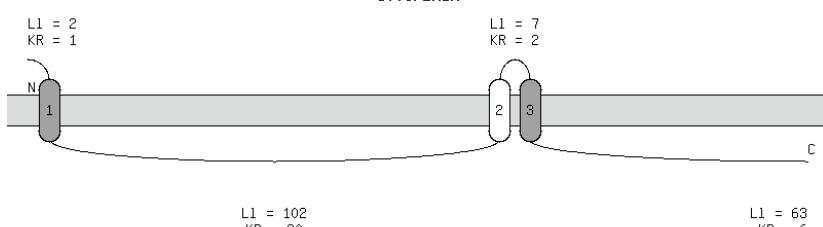
| BIO

ALG14-149

| BIO

□ Segment Putative
■ Segment Certain

B



L1: Loop length
KR: Number of Lys and Arg

EXTRACELLULAR

C

<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	MK TAY [LAS LV LIV S TAYVIR L I A I LPFFHT QAGTEKDTKD GVNL LK I RKS	50
<i>H. sapiens</i> Alg14	1	- - - - M V C V L V LA - - AAAG A V A V F L L R I WVVLRS - - M - - - D V T P R	34
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	51	S KKP L K I F V F L GSGGHT G E M IRL L EN Y QD - L L L G - K S I V Y L G Y S D E A S R Q	98
<i>H. sapiens</i> Alg14	35	E - - S L S I L V V AGSGGHT T E I L R L L G S L S - - - NAYSPRH Y V IAD T D E M S A N	79
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	99	R F A H F - - - I K K - - - - F G H C K V K Y Y E F M K A R E V K A T L L Q S V K T I I G T L V Q	140
<i>H. sapiens</i> Alg14	80	K I N S F - E L D R ADRDPSNM Y T K Y Y I H R I P R S R E V Q S W P S T V F T T L H S M W L	128
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	141	S F V H V V R I R F A M C G S P H L F L L N G P G T C C I I S F W L K I M E L L L P L L G S S H I V	190
<i>H. sapiens</i> Alg14	129	S F P L I H R - - - - V K P D L V L C N G P G T C V P I C V S A L L G G I L G - - I K K V I V	170
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	191	Y V E S L A R I N T P S L T G K I L Y W V V D E F I V Q W Q E L R D N Y L P R S K W F G I L V -	237
<i>H. sapiens</i> Alg14	171	Y V E S I C R V E T L S M S G K I L F H L L S D Y F I V Q W P A L K E K - Y P K S V Y L G R I V -	216

Abbildung 26: Hydropathieplot von *S. cerevisiae* Alg14p und dem humanen Homolog (A) und die daraus resultierende mögliche Membranmorphologie (C), wobei hier von drei Transmembranspannen ausgegangen wird. Die weniger hydrophobe zweite Domäne (AS 125-150) ist hell dargestellt. Die Proteine Alg14p aus *S. cerevisiae* und Mensch haben große Ähnlichkeit sowohl hinsichtlich der Sequenz (C), als auch des Hydropathieplots (A). Die verkürzten Fragmente von ALG14 wurden anhand der Topologievorhersagen konstruiert (B).

Zunächst wurde die Topologie von *S. cerevisiae* Alg14p anhand der Vorhersagen genauer untersucht. Der erste Bereich enthält die meisten hydrophoben Aminosäuren und erstreckt sich über die Aminosäuren 9-30. Ein zweiter Bereich ist zwischen AS 125 bis 150 zu erkennen, der dritte Bereich schließt sich daran an und geht bis AS 190. Mit diesen Hinweisen wurden neben dem Volllängen-Alg14p zwei verkürzte Konstrukte hergestellt, die jeweils an den C-terminalen

Enden mit dem BIO-Epitop fusioniert waren (Abb. 26). Diese 70 Aminosäuren lange Peptidsequenz wird *in vivo* durch die Protein-Biotin-Ligase (*PBL*), welche ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist, biotinyliert und kann über das Streptavidin-Peroxidasekonjugat im *Western Blot* nachgewiesen werden. Diese Tatsache wurde für die folgenden Topologiestudien ausgenutzt. Ist der C-terminale Bereich des jeweiligen *ALG14-BIO* Fusionsproteins im Cytoplasma lokalisiert, kann das Protein detektiert werden. Wird kein Signal erhalten, befindet sich der C-Terminus luminal im ER. Für das humane Homolog von Alg14p wurde analog verfahren.

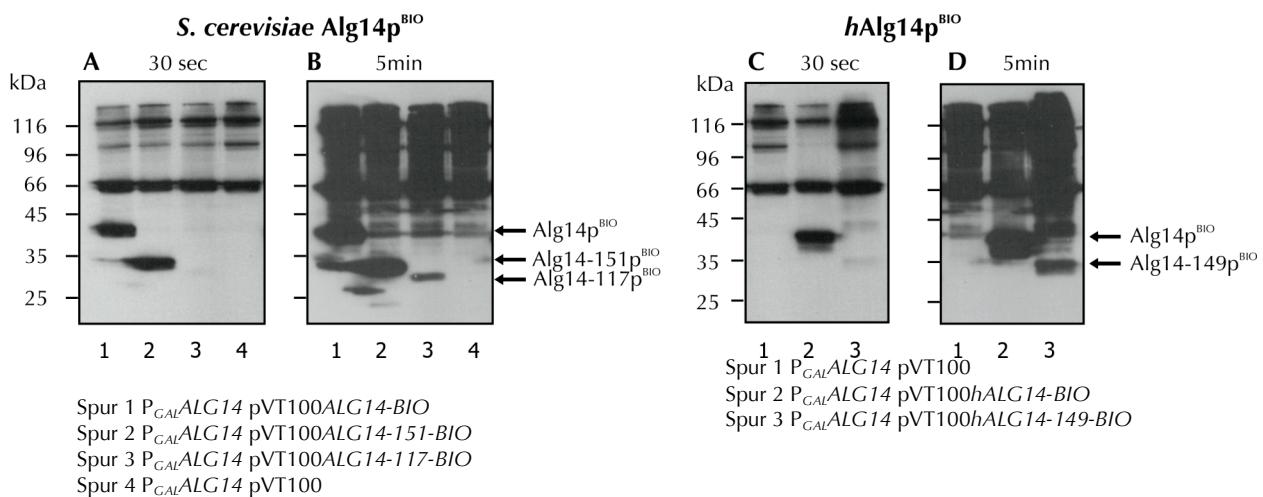


Abbildung 27: Western Blot Analyse der ALG14 BIO-Fusionskostrukte von *S. cerevisiae* (A, B) und Mensch (C, D). Der Unterschied zwischen den Abbildungen (A, B bzw. C, D) besteht lediglich hinsichtlich der Expositionszeit des Röntgenfilms. Um auch schwächere Signal detektieren zu können, wurde der zweite Röntgenfilm länger exponiert. Die weiteren Signale die zu erkennen sind, sind endogene biotinylierte Proteine der Hefe wie Pyruvatcarboxylasen 1 und 2 (Pyc1p, Pyc2p) sowie Acc1p und Hfa1p.

Wie in Abbildung 27 zu sehen, zeigten alle Konstrukte ein „BIO-Signal“ und damit die Lokalisation des C-Terminus in Cytoplasma. Dies bedeutet, dass *S. cerevisiae* Alg14p im Gegensatz zu den Vorhersagen nur eine Transmembranspanne hat und die beiden hydrophoben Bereiche in der C-terminalen Hälfte des Proteins die Membran nicht durchspannen. Somit ist der größte Teil des Proteins auf der cytoplasmatischen Seite des ER lokalisiert. Dies gilt auch für das humane Alg14p.

Das Signal für das kürzeste Fusionskonstrukt *S. cerevisiae* Alg14-117 war nur nach längerer Exposition nachweisbar (Abb. 27 B). Allerdings galt dies auch für das Protein A Fusionskonstrukt (hier nicht gezeigt), so dass die Annahme nahe liegt, dass dieses stark verkürzte Protein schneller abgebaut wird und deshalb das Signal insgesamt schwächer ist.

Die Lokalisationsanalysen des C-terminalen Bereiches von hAlg14p lassen auf analoge Topologie – wie sie auch in *S. cerevisiae* Alg14p auftritt – schließen, da beide Konstrukte ein „BIO-Signal“ ergaben und so die Existenz einer zweiten Transmembranspanne ausgeschlossen werden konnte. Auch in diesem Fall wurde das kürzere Fragment – *hALG14-149* – nur nach längerer Exposition detektiert.

Diese Befunde wiesen auf eine Membran topologie sowohl für *S. cerevisiae* Alg14p als auch für hAlg14p mit einer Transmembranspanne am N-terminalen Ende der Proteine hin. Allerdings war die Lokalisation des C-Terminus des kürzesten *S. cerevisiae* Alg14-117 Konstrukts noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Da es sich dabei um ein sehr kurzes Peptidfragment mit insgesamt nur 187 (mit Bio-Epitop) Aminosäuren handelt, wurde mit Hilfe einer anderen Methode die cytoplasmatische Lokalisation des C-Terminus abgesichert.

Diesen Untersuchungen lag das erstmals von Christian Sengstag et al. [111] verwendete Prinzip zu Grunde das auf einer doppelten Kontrolle der ER- bzw. cytoplasmatischen Lokalisation von Proteinsequenzen basiert. Die zu untersuchende Sequenz wird dazu einmal mit der Invertase und zum anderen mit dem *HIS4C* Gen fusioniert. Die Invertase ist ein *N*-glykosyliertes Protein aus *S. cerevisiae* und dient zur Kontrolle der ER Lokalisierung, die anhand der Glykosylierung überprüft werden kann. *HIS4C* codiert für die Histidinol-Dehydrogenase und katalysiert die Umwandlung von Histidinol in Histidin. Diese Reaktion findet ausschließlich im Cytoplasma statt. Zur Untersuchung des Fusionskonstrukts mussten Hefezellen verwendet werden, deren genomische Kopie von *HIS4C* deletiert war. Konnten die mit den jeweiligen Fusionskonstrukten transformierten Hefezellen auf Histidinol-Medium ohne Histidin wachsen, war das *HIS4C* Genprodukt und damit der C-Terminus der fraglichen Sequenz cytoplasmatisch orientiert. Erfolgte kein Wachstum auf Histidinol war *HIS4C* im ER lokalisiert und damit räumlich getrennt von Histidinol. In diesem Fall ist die Invertase glykosyliert. Dies kann durch einen Endoglukosidase H Verdau verifiziert werden. Dabei werden die *N*-Glykanketten vom Protein abgespalten, was eine veränderte Mobilität in der SDS-PAGE zur Folge hat.

Das Fusionskonstrukt ist in Abbildung 28 A skizziert und besteht aus *ALG14-237* bzw. *ALG14-117*, einem HA Epitop zum Nachweis, gefolgt von der Invertase und dem *HIS4C* Gen.

Das Biotin Signal des verkürzten Konstrukts *S. cerevisiae ALG14-151* kann aufgrund der obigen Versuche bereits als gesichert gelten, so dass die Lokalisation dieses C-terminalen Endes im Cytosol nicht zweifelhaft ist. Das fragliche Konstrukt ist das mit nur 117 Aminosäuren. Deshalb wurden das Volllängen Alg14p und das Alg14-117p mit dieser Methode untersucht.

Die Befunde aus den Analysen mit den „Bio-Fusionskonstrukten“ wurden durch diese Untersuchungen bestätigt (Abb. 28 B). Beide Konstrukte zeigten Wachstum auf Histidinol. Alg14p weist somit lediglich eine Transmembranspanne im N-terminalen Bereich auf und der große Rest des Proteins ist cytoplasmatisch orientiert (Abb. 28 B, C).

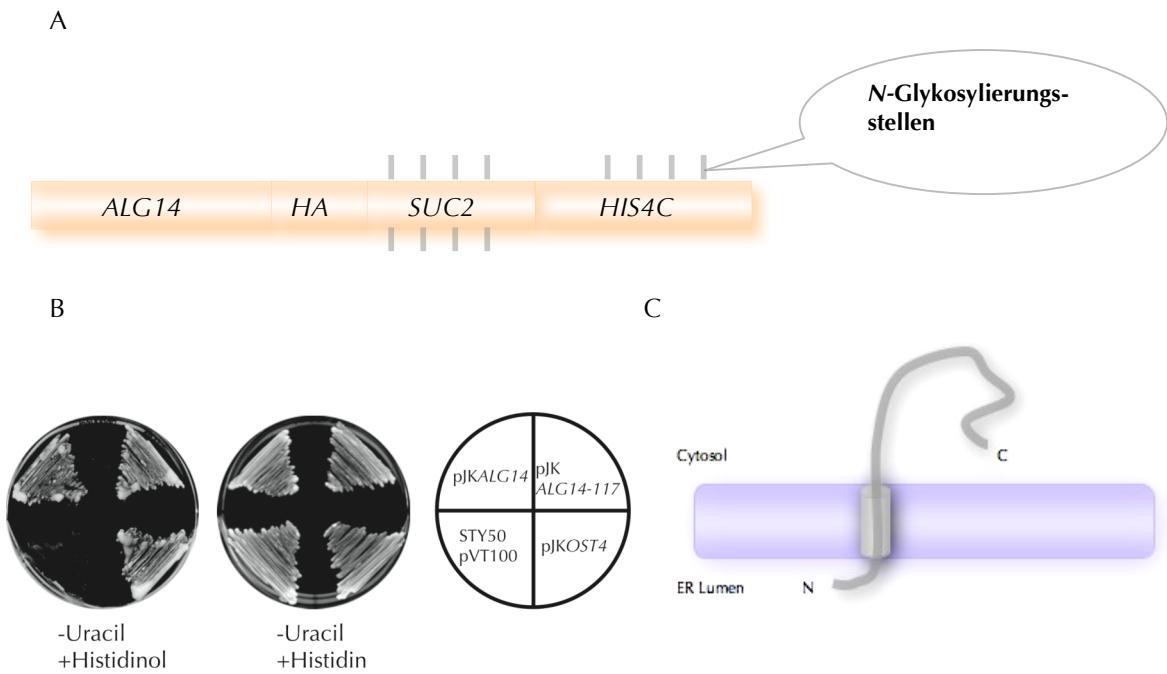


Abbildung 28: Das Fusionskonstrukt von *ALG14* mit der Invertase (*SUC2*) und dem *HIS4C* Gen, nach [112] (A). Die Wachstumsanalyse auf Selektivplatten mit Histidinol/Histidin ergab, dass Hefezellen mit den Fusionskonstrukten pJK90*ALG14* bzw pJK90*ALG14-117* sowohl auf Histidin als auch auf Medium mit Histidinol wachsen konnten (B). Der verwendete Hefestamm STY50 besitzt keine genomische Kopie der Hisidinoldehydrogenase und diente als Negativkontrolle. Die pJKOST4 diente als Positivkontrolle, die keinen Unterschied bezüglich des Wachstums auf Histidinol zu den *ALG14* Konstrukten aufwies (B). Die daraus gefolgte Membrantopologie, die auch für hAlg14p gilt, ist in (C) dargestellt.

ALG14 aus *H. sapiens* teilt sowohl hinsichtlich der Aminosäuresequenz als auch des Hydropathieplots (vgl. Abb. 26) große Ähnlichkeit mit *S. cerevisiae* Alg14p. Die Topologiestudien ergaben, dass auch die Membranverankerung von hAlg14p über eine N-terminale Transmembranspanne gewährleistet wird, was zu einer ähnlichen Membrantopologie führt. Die fehlende Interaktion von *S. cerevisiae* Alg13p mit hAlg14p kann also nicht durch eine unterschiedliche Membrantopologie der Alg14 Proteine von Hefe und Mensch erklärt werden.

2.7.2 Der C-Terminus von Alg14p ist essentiell für die Glukosamintransferaseaktivität

Die Topologiestudien des Alg14 Proteins aus *S. cerevisiae* zeigten, dass das Protein N-terminal eine Transmembranspanne besitzt und einen großen cytoplasmatisch orientierten Teil. Die dabei verwendeten Konstrukte (*ALG14-BIO*, *ALG14-151-BIO* und *ALG14-117-BIO*) wurden *in vivo* auf UDP-GlcNAc Transferase-Aktivität getestet. Das um 86 Aminosäuren (\approx 1/3 des Proteins) verkürzte Alg14-151p führte zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Dieser resultierte jedoch nicht aus einem Unvermögen mit Alg13p zu interagieren (Abb. 29). In diesem Experiment wurde die *in vivo* Aktivität der GNT nicht wie in den vorherigen Fällen anhand der CPY analysiert, sondern durch die Glykosylierung des ER residenten Proteins Wbp1p, das eine Untereinheit des OST Komplexes ist und gleichzeitig auch als Ladungskontrolle diente. Wbp1p besitzt zwei N-glykosidisch gebundene Zuckerketten, deren Fehlen sich wie bei der CPY bei der SDS-PAGE durch weitere Proteinbanden ausdrückt. Der dabei verwendete Hefestamm $P_{TET}ALG14$ exprimierte genomisch integriert Alg13p^{ZZ}. Die jeweiligen *ALG14* Konstrukte waren plasmidcodiert.

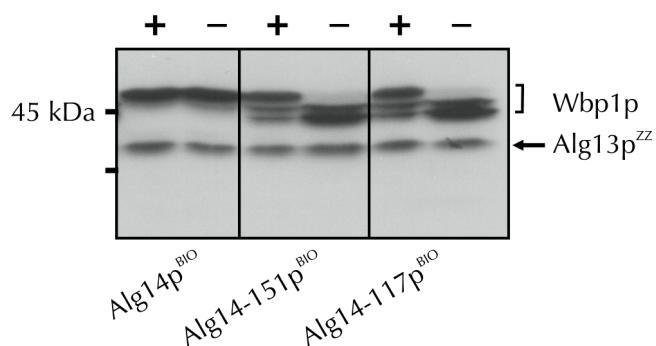


Abbildung 29: *In vivo* Aktivitätsanalyse der verkürzten *ALG14* Fragmente. „+“ drückt die Expression der genomischen Kopie von *ALG14* und „–“ die Repression aus. Die Dekoration des *Western Blots* erfolgte durch einen anti-Wbp1p Antikörper. Es konnten beide Proteine (Wbp1p und Alg13p) gleichzeitig detektiert werden, da das ZZ Epitop an *ALG13* mit allen konstanten Domänen von Antikörpern interagiert. Die Inaktivität der verkürzten Alg14 Proteine ist durch die Unterglykosylierung von Wbp1p zu erkennen. Aber in allen Spuren ist kein Unterschied hinsichtlich der membrangebundenen Form von Alg13p zu beobachten.

Die in Abbildung 29 dargestellte *Western Blot* Analyse der verkürzten *ALG14* Konstrukte (Alg14-151p und Alg14-117p) zeigt nach Repression der genetischen Kopie von *ALG14* eine starke Unterglykosylierung des Wbp1 Proteins, was die enzymatische Inaktivität dieser Alg14p Proteine demonstriert. Da sich die Repression des genetisch codierten Alg14p nicht in einer veränderten Membranlokalisierung von Alg13p bemerkbar macht, ist davon auszugehen, dass selbst Alg14p mit nur 117 Aminosäuren immer noch in der Lage ist, Alg13p zu binden. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Unterglykosylierung von Wbp1p bei gleichzeitiger Expression der genetischen Kopie und der verkürzten Variante von Alg14p (Abb. 29, jeweils mit „+“ gekennzeichnete Spuren). Dies ist nur dadurch zu erklären, dass Alg13p an diese Varianten

bindet, der Komplex aber inaktiv ist. So sind unterglykosylierte Formen von Wbp1p vorhanden, obwohl genomisch intaktes *ALG14* exprimiert wurde.

Durch eine Mutationsanalyse sollte Alg14p hinsichtlich essentieller Aminosäuren noch weiter charakterisiert werden. Zum einen wurde eine ortsspezifische Mutation durch den gerichteten Austausch von drei Aminosäuren innerhalb eines hoch konservierten Bereichs von Alg14p, zum anderen der willkürliche Austausch durch Zufallsmutagenese und Selektion auf inaktives Protein durchgeführt.

2.7.2.1 Zielgerichtete Mutagenese von Alg14p

Das hoch konservierte Motiv ¹⁹¹YVE¹⁹³ (vgl. Abb. 26 C) befindet sich im für die Enzymaktivität essentiellen C-terminalen Bereich. Deshalb wurden diese Aminosäure gegen drei Alaninreste ausgetauscht (*ALG14-191AAA*) und *in vivo* die GNT Aktivität des mutierten *ALG14* in dem Hefestamm $P_{GAL}ALG14$ bestimmt. In Abbildung 30 ist die *Western Blot* Analyse der CPY dargestellt. Die CPY war in Hefezellen, die Alg14-191AAAp exprimierten, stärker unterglykosyliert als in den Hefezellen ohne Plasmid (Abb. 30 A). Um auszuschließen, dass die Inaktivität auf keine oder zu schwache Expression des mutierten Gens zurückzuführen war, wurde die Expression des *ALG14-191AAA* überprüft (Abb. 30 B). In der *Western Blot* Analyse war kein Unterschied zu Wildtyp Alg14p zu beobachten. Ferner wurde das Wachstum der entsprechenden Hefezellen auf Glukose oder Galaktose untersucht.

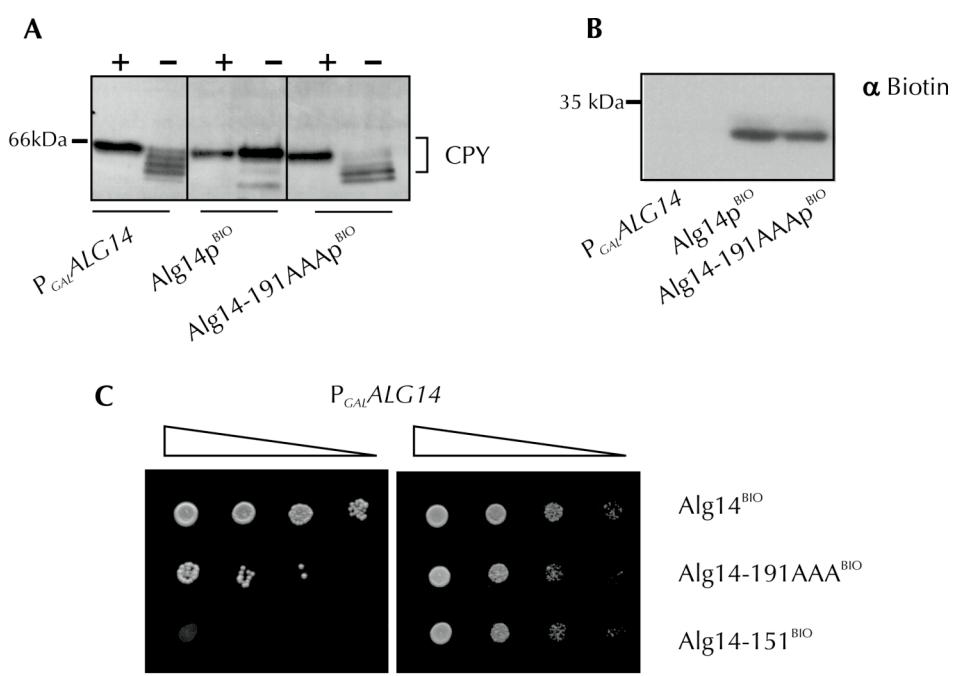


Abbildung 30: *In vivo* Analyse der dreifachen Punktmutation ¹⁹¹AAA¹⁹³ im *ALG14* Gen. Sowohl bei der Analyse der CPY als auch im Wachstumstest zeigt das mutierte Alg14p Enzym reduzierte Transferaseaktivität im Vergleich zu unmutiertem Alg14p. Das Konstrukt ohne die C-terminale Domäne Alg14-151p führte zur vollständigen Inaktivität der GNT. Beim Wachstumstest (C) wurden in Abstufungen von je einer Zehnerpotenz 3×10^4 bis 3×10^1 Zellen auf Agarplatten gebracht, die jeweils Glukose oder Galaktose enthielten.

Die CPY wurde bei Expression des mutierten Alg14-191AAp kaum glykosyliert, was die Inaktivität dieses mutierten Proteins demonstriert.

Hefezellen, die Alg14-191AAA enthielten, zeigten bei der Wachstumsanalyse wesentlich besseres Wachstum als ein Vergleichsstamm, dem die C-terminale Domäne von *ALG14* fehlt (Alg14-151p). Dies deutet darauf hin, dass diese drei Aminosäuren (¹⁹¹YVE¹⁹³) wichtig für die Aktivität von Alg14p sind, aber die reduzierte Aktivität nicht zu einem letalen Wachstumsphänotyp führt. Auch dieses mutierte Protein ist in der Lage, Alg13p zu binden (vgl. Abb. 32 B).

2.7.2.2 Herstellung und funktionelle Analyse einer *ALG14* Genbank

Aus dem Sequenzvergleich von Alg14p aus *S. cerevisiae* und dem humanen Homolog (Abb. 26 C) ist ersichtlich, dass beide Proteine einige homologe Bereiche teilen. Allerdings kann das Alg13p aus *S. cerevisiae* nicht mit hAlg14p interagieren (Abb. 25). Um essentielle Aminosäuren in Alg14p aufzufinden, die für die Interaktion mit Alg13p verantwortlich sein könnten, wurde eine Zufallsmutagenese durchgeführt, bei der zwischen einer und drei Aminosäuren pro Gen mutiert werden sollten. Die Mutationen wurden mit Hilfe einer DNA Polymerase (*mutazyme*, STRATAGENE) eingeführt, deren Fehlerrate die von üblicherweise verwendeten Taq Polymerasen um mehrere Zehnerpotenzen übersteigt. Dabei kann die Anzahl der Mutationen sowohl über die eingesetzte DNA-Menge als auch über die Anzahl der Zyklen kontrolliert werden.

Es wurden Varianten von *ALG14* generiert, die zufällig an willkürlichen Stellen Nukleotidaustausche trugen (errechnet zwischen 2 und 3 Basenaustausche/Alg13). Gesucht wurde nach Proteinen ohne GlcNAc Transferase Aktivität.

Um Varianten *mutALG14* zu erzeugen, wurden 23 ng Wildtyp *ALG13* DNA eingesetzt, die ca. 300-fach amplifiziert wurde. Die errechnete Mutationshäufigkeit lag bei 2 bis 6 Basenaustauschen, was durch Sequenzierung eines Klons überprüft wurde. Die Herstellung der Genbank ist unter 6.2.5 beschrieben. Aus dieser Genbank wurden 1 µl, 2 µl und 5 µl in drei Ansätzen in P_{GAL}*ALG14* Zellen (6.2.9) transformiert und auf insgesamt 8 Selektivplatten mit Galaktose als Kohlenhydratquelle plattiert, so dass die endogene Expression von Alg14p zunächst gewährleistet war. Von den daraus erhaltenen Transformanden wurden 1000 Einzelklone analysiert. Da P_{GAL}*ALG14* Zellen zunächst auch auf glukosehaltigem Medium wachsen können, erfolgte ein achtständiges Zwischenwachstum in Mikrotiterplatten in 200 µl YNB/CAA/Glc Medium bei 30°C, um genomisch codiertes *ALG14* soweit zu reprimieren, dass ein eindeutiger Effekt des plasmidcodierten, mutierten Proteins zu beobachten war. Danach wurden die Einzelklone auf YNB/CAA/Glc Platten getüpfelt und auf Wachstum überprüft. Gleichzeitig wurde das Wachstum der gleichen Klone auch auf Galaktosemedium kontrolliert, um zu verhindern, dass aus

schlechterem Wachstum, das aus geringerer Zellmenge resultiert, falsch positive Kolone gewonnen wurden. Zwei Beispielplatten sind in Abb. 31 gezeigt.

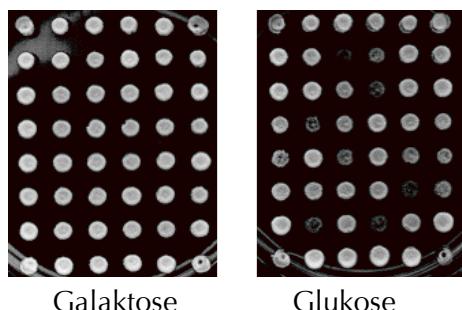


Abbildung 31: Wachstum auf Galaktose- bzw. Glukosemedium von Transformanden aus der Zufallsmutagenese. Es sind zwei Beispielplatten dargestellt. Nachfolgend wurden nur Klone analysiert die kein Wachstum auf Glukose aufwiesen.

Die wahrscheinlichste Mutation, die zu einem inaktiven Enzym führt, ist eine Deletion oder Insertion von Basen, die zu einem *frame shift* führen. Um solche Klone eliminieren zu können, wurde *ALG14* C-terminal mit dem bereits erwähnten BIO-Epitop fusioniert, so dass über das „Bio-Signal“ die Expression des Volllängen *ALG14* Gens überprüft werden konnte. In der Wachstumsanalyse wurden insgesamt 150 Klone gefunden, die auf Glukosemedium kein Wachstum zeigten. Von diesen Zellen wurden Membranen präpariert und im *Western Blot* die Biotinylierung von Alg14p überprüft. Aus den insgesamt 9 Klonen mit eindeutigem „BIO Signal“ wurden die Plasmide isoliert, in *E. coli* retransformiert und anschließend sequenziert. Davon hatten 7 Klone einzelne Aminosäureaustausche die in Abb. 36 dargestellt sind. Die Funktionalität der mutierten Proteine, die aus den plasmidcodierten *ALG14* Sequenzen resultierten, wurde durch Wachstumstests und die Glykosylierung der CPY untersucht (Abb. 32 A). Alle Klone zeigten sowohl einen Wachstumsphänotyp als auch einen Defekt in der N-Glykosylierung (Abb. 32 A, C). Ferner waren alle Varianten, auch Alg14-191AAA, in der Lage, Alg13p zu binden (Abb. 32 B).

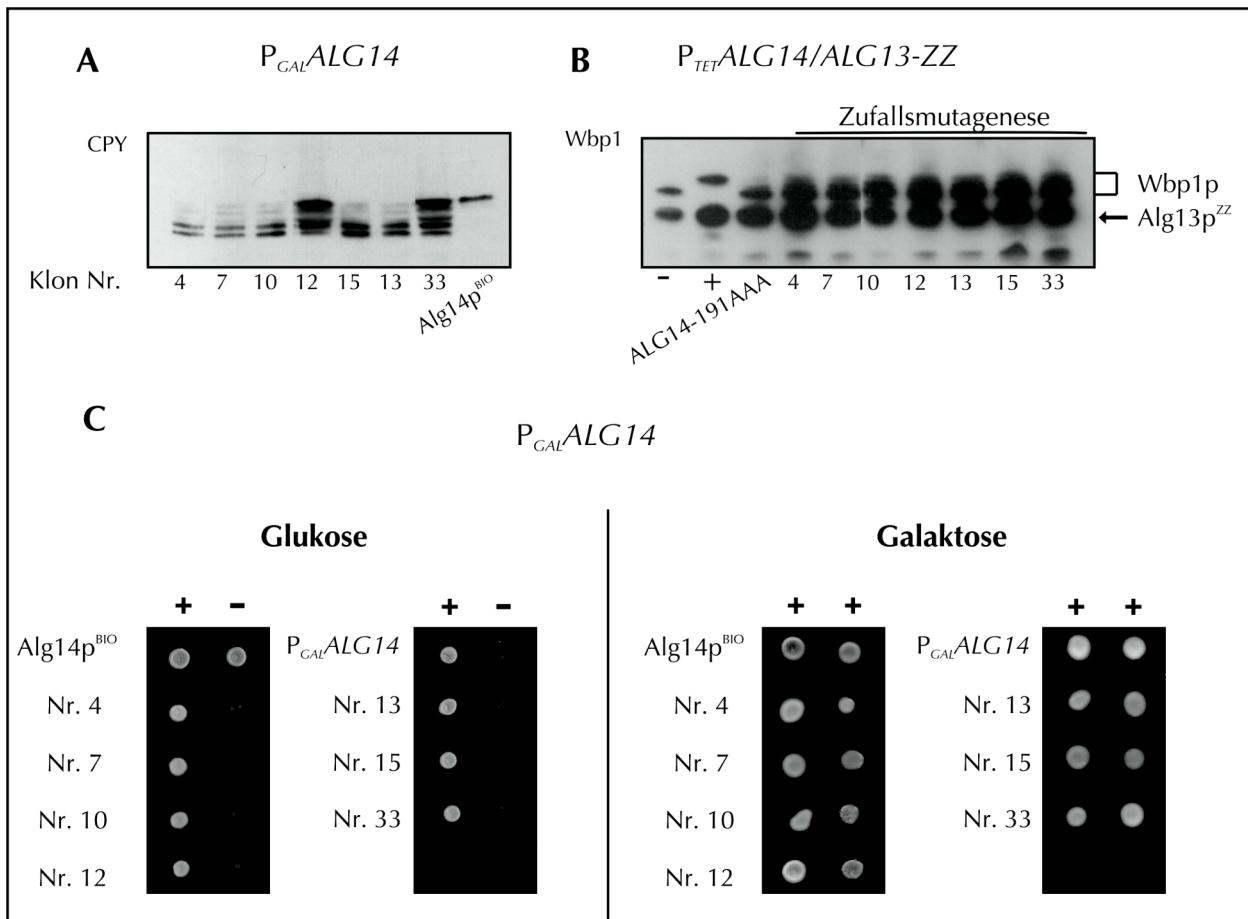


Abbildung 32: In vivo Funktionalitätsanalyse der durch Zufallsmutagenese erhaltenen mutALG14 Klone. „+“ zeigt die Expression des genomisch codierten *ALG14* Gens an, „-“ die Repression. Alle Klonen wiesen sowohl bezüglich der N-Glykosylierung als auch des Wachstums einen eindeutigen Defekt auf. Die Klonen Nr. 12 und Nr. 33 zeigten einen weniger starken Effekt bezüglich der Glykosylierung der CPY (A), aber bei der Wachstumsanalyse war kein Unterschied zu den anderen *mutALG14* Klonen festzustellen (C). Weiter war durch keine Mutation die Interaktion mit Alg13p inhibiert (B).

Das Ergebnis der Zufallsmutagenese zeigte einige Häufungen von Aminosäureaustauschen, die zu enzymatisch inaktivem Alg14p führen. Dabei konnten drei Bereiche definiert werden. Zunächst die Transmembranspanne (ca. AS 9-30), das hoch konservierte Motiv ⁶²GSGGH⁶⁶ und der C-terminale Bereich ab AS 164. Diese Ergebnisse decken sich mit der vorher getroffenen Aussage, dass die C-terminale Domäne des Proteins (AS 151-237) essentiell für die Enzymaktivität der GNT ist (Abb. 29, 30 C). Weiter bestätigte sich die hinsichtlich der Enzymaktivität vermutete Bedeutung des GSGGH Motifs.

<i>S.c.Alg14</i>	1	MKTAYLASLV	LIVSTAYVIR	LIAILPFFHT	QAGTEKDTKD	GVNLLKIRKS	50	
<i>zml4</i>	1	50	
<i>zml7</i>	1	50	
<i>zml10</i>	1	50	
<i>ZM13</i>	1	.	E	.	.	.	50	
<i>zml15</i>	1	.	T	.	.	.	50	
<i>zml12</i>	1	.	.	V	A	.	50	
<i>zml24</i>	1	50	
<i>zml33</i>	1	50	
<i>H.s. Alg14</i>	1	~~~~~MVCVL	VLAAGA	GAVA	VFL	RIVVV	LRSM DVT P <small>R</small> E	35
<i>S.c.Alg14</i>	51	SKKPLKIFVF	LGS GGHTGEM	IRLLENYQDL	LLGKSIVYLG	YSDEASRQRF	100	
<i>zml4</i>	51	.	Y	.	.	.	100	
<i>zml7</i>	51	100	
<i>zml10</i>	51	100	
<i>ZM13</i>	51	.	D	.	.	.	100	
<i>zml15</i>	51	100	
<i>zml12</i>	51	100	
<i>zml24</i>	51	100	
<i>zml33</i>	51	100	
<i>H.s. Alg14</i>	35	~~~S.S.L.V.A.	T	I	L	GSLSNAYSPRH	YIADTDEMSANKIN	82
<i>S.c.Alg14</i>	101	AHFIKKFG~~	~~~HCKVKY	YEFMKAREVK	ATLLQSVKTI	IGTLVQSFVH	144	
<i>zml4</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml7</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml10</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>ZM13</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml15</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml12</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml24</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>zml33</i>	101	.	~~~	~~~	.	.	144	
<i>H.s. Alg14</i>	83	S FELDRADRD	PSNMYTYYI	H RIPRS	Q	QSWPSTF.T	LHSMWL..PL	132
<i>S.c.Alg14</i>	145	VVRIRFAMCG	SPHLFLLNGP	GT CCIIISFWL	KIMELLPL	GSSHIVYVES	194	
<i>zml4</i>	145	.	.	E	.	.	194	
<i>zml7</i>	145	194	
<i>zml10</i>	145	194	
<i>ZM13</i>	145	.	.	W	.	.	194	
<i>zml15</i>	145	.	.	.	I	.	194	
<i>zml12</i>	145	194	
<i>zml24</i>	145	194	
<i>zml33</i>	145	194	
<i>H.s. Alg14</i>	133	I H . VK~~~ ~	~ D . V C	VP.CVSA	LLLGI.G~ I	KKVI	.	174
<i>S.c.Alg14</i>	195	LARINTPSLT	GKILYWVVDE	FIVQWQELRD	NYLPRSKWFG	I LV * ~	238	
<i>zml4</i>	195	GS	239	
<i>zml7</i>	195	S	I	.	.	GS	239	
<i>zml10</i>	195	.	.	.	L	GS	239	
<i>ZM13</i>	195	GS	239	
<i>zml15</i>	195	.	.	.	S	GS	239	
<i>zml12</i>	195	E	.	.	.	GS	239	
<i>zml24</i>	195	GS	239	
<i>zml33</i>	195	.	I	.	.	GS	239	
<i>H.s. Alg14</i>	175	I C . VE . L . MS	.	F HLS.Y	.PAKEK.P~K.VYL	R	* ~ 217	

Abbildung 33: Proteinalignment der aus der Zufallsmutagenese erhaltenen Klone (zm) mit dem *S. cerevisiae* Alg14p. Identische Aminosäuren sind durch Punkte gekennzeichnet, Amiosäureaustausche durch den entsprechenden Buchstaben. Zur Verdeutlichung der homologen Bereiche ist das humane Homolog ebenfalls abgebildet. Der Klon No. 24 zeigt im Wachstumstest keinen Defekt, aber leichte Unterglykosylierung der CPY. Die Aminosäuresequenz wird in Kapitel 3.3 näher beschrieben, weshalb die Sequenz hier ebenfalls abgedruckt ist. Die bis zum Menschen konservierten Bereiche in denen Mutationen gefunden wurden bzw. durch zielgerichtete Mutation verändert wurden sind orange gekennzeichnet. Bei grau unterlegten Aminosäuren handelt es sich bezüglich des Hefe Alg14p um Aminosäuren mit ähnlicher Seitenkette.

Zusammenfassung der Aminosäureaustausche und der entsprechenden Klone

Klon Nr	Austausch
Klon 4:	H66Y
Klon 7:	A196S, T204I
Klon 10:	G16E, I235L
Klon 12:	M177I, A196E , R229S
Klon 13:	V10E, G65D
Klon 15:	S8T, C167W
Klon 33:	T204I

2.8 Ein Protein aus *Leishmania major* katalysiert in *S. cerevisiae* die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass MurG aus *E. coli* aus nur einer Polypeptidkette besteht und homologe Bereiche zu Alg13p und Alg14p besitzt. Auch die eukaryotischen Organismen der Gattung der Trypanosomen, zu der *Leishmania major* gehört, besitzen N-glykosulierte Proteine, deren Oligosaccharidstruktur sich allerdings leicht von der in Hefe gefundenen unterscheidet. Der Aufbau des LLO weist in beiden Organismen Dol-PP-GlcNAc₂ auf. Also ist die Enzymaktivität, die das Dimer Alg13p/Alg14p katalysiert, auch in diesem Organismus zu finden. Das entsprechende homologe Gen codiert jedoch für ein Protein das nur aus einer Polypeptidkette mit der Anordnung *ALG14-ALG13* aufgebaut ist. Zunächst sollte nun geklärt werden, ob dieses Protein das entsprechende Orthologe ist und auch in Hefe GlcNAc Transferaseaktivität besitzt. Dazu wurde das entsprechende Gen, das freundlicherweise von Françoise Routier (Hannover) bereitgestellt wurde, in den Vektor pVT100 kloniert und anschließend in einen Hefestamm transformiert, in dem sowohl *ALG13* als auch *ALG14* unter der Kontrolle eines Galaktose induzierbaren Promotor steht ($P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$). Bei Wachstum in Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle sind die Gene *ALG13* und *ALG14* reprimiert und die Aktivität des *Leishmania* Gens (*L. major ALG14-ALG13*) konnte *in vivo* durch Wachstum und die Glykosylierung der CPY analysiert werden.

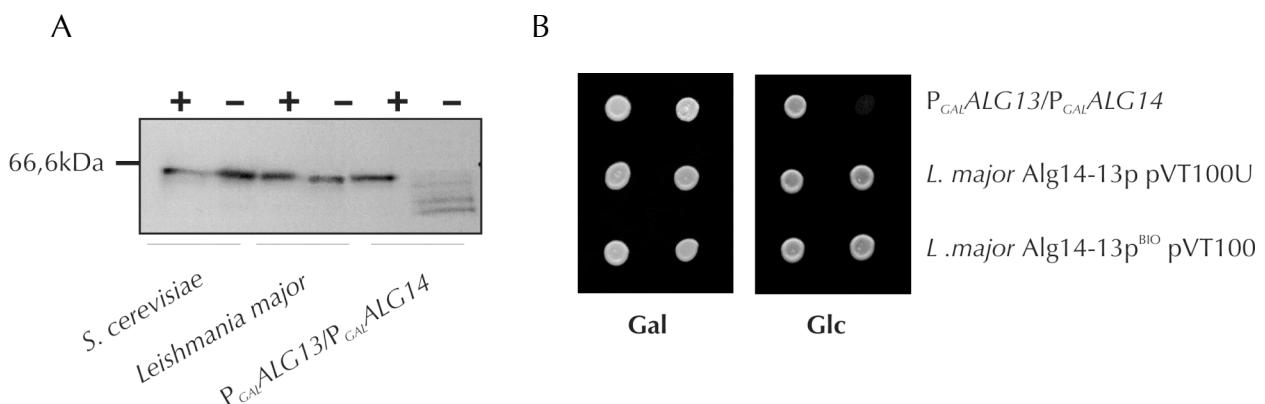


Abbildung 34: Wachstumsanalyse (B) und Analyse der N-Glykosylierung (A) anhand der CPY von *L. major ALG14-ALG13*. Alle Genprodukte komplementieren den Wachstumsphänotyp von $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ Hefezellen (A). Das *L. major* Gen komplementiert auch den Glykosylierungsdefekt *in vivo* (B).

Der Ausgangshefestamm $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ weist eine starke Unterglykosylierung der CPY und kein Wachstum auf Agarplatten mit Glukose auf (Abb. 34 B). Bei Expression des *Leishmania major* Homologs war eine vollständige Komplementation des Phänotyps des $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ Hefestamms zu beobachten. Sowohl die Analyse des Glykosylierungsstatus der CPY (Abb. 34 A) als auch der Wachstumstest (Abb. 34 B) zeigten, dass alle epitopmarkierten Varianten des Leishmaniagens auch in *S. cerevisiae* aktiv waren. Obwohl die Enzymaktivität die ER Lokalisation dieses Homologen Proteins aus *Leishmania major* bereits vermuten ließ, wurde die

Lokalisation dennoch mittels eines GFP-Fusionsproteins *in vivo* am konfokalen Fluoreszenzmikroskop überprüft und ist in Abbildung 35 dargestellt.

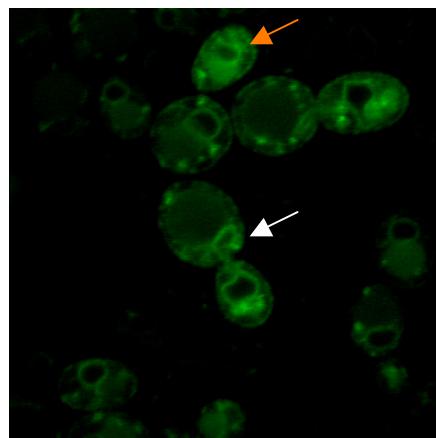


Abbildung 35: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Alg14-Alg13p^{GFP} aus *L. major*. Die typische Lokalisation des ER in der Hefezelle ist unterhalb der Plasmamembran und um den Zellkern. In der Mitte der Abbildung ist eine Zelle zu sehen, deren Zellkern sich gerade teilt. Um beide Strukturen ist die Fluoreszenz zu erkennen (weißer Pfeil).

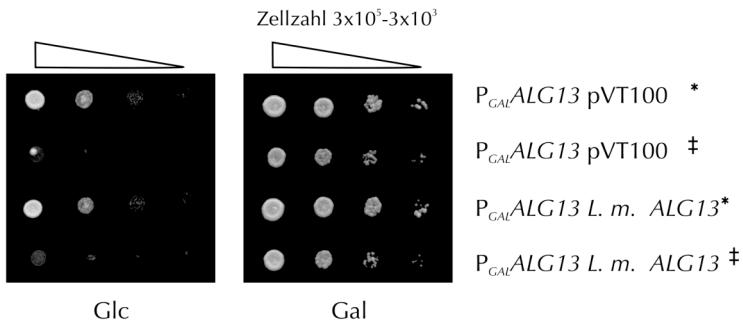
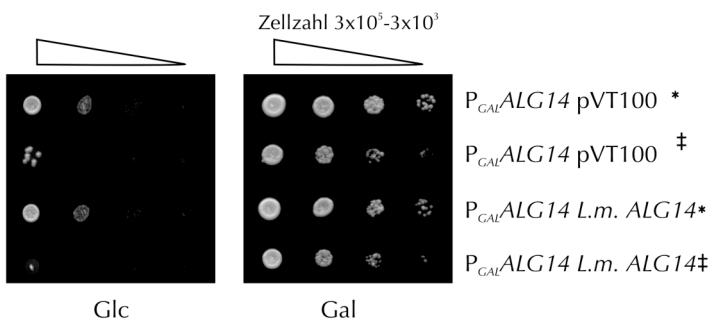
Die Analyse des *L. major* Alg14-Alg13p mittels eines GFP-Fusionsproteins zeigte im konfokalen Fluoreszenzmikroskop die typische ER Lokalisation in der Hefe. Das ER befindet sich einerseits unterhalb der Plasmamembran um die gesamte Zelle und um den Zellkern. In diesen Bereichen war auch die Fluoreszenz des Fusionsproteins festzustellen. Eine sich teilende Zelle befindet sich in der Mitte der Abbildung. Die ER Struktur um den Zellkern kann gut in beiden Zellen identifiziert werden (weißer Pfeil). In einigen Zellen wurde allerdings zum Teil Fluoreszenz in der Vakuole beobachtet (roter Pfeil). Dabei kann es sich um eine Mislokalisierung des Fusionsproteins, um in der Degradation begriffenes Protein, aber auch um einzelnes GFP Protein, das vom Fusionsprotein abgespalten wurde, handeln. Die exakte Ursache der Fluoreszenz, die in der Vakuole beobachtet wurde konnte nicht eindeutig geklärt werden. Da aber die Enzymaktivität eindeutig war und die ER Lokalisation auch in Zellen die in der Vakuole Fluoreszenz zeigen gesichert ist, wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die vakuolare Lokalisation der Fluoreszenz genauer zu untersuchen.

Die Untersuchungen der homologen Gene aus *S. pombe* und *Homo sapiens* wurden in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Dabei wurde festgestellt, dass das Alg13p Homolog aus *S. pombe* das *S. cerevisiae* Protein ersetzte, die humanen homologen Proteine, einzeln in *S. cerevisiae* exprimiert, die Funktion der GNT jedoch nicht erfüllen konnten. Durch eine Trennung des Gens aus *L. major* sollte nun analysiert werden, ob die jeweiligen einzelnen Proteine aus *L. major* mit dem entsprechenden Proteinen aus *S. cerevisiae* interagieren können und eine aktive GlcNAc Transferase bilden.

<i>L. major</i> Alg14-Alg13	1	- - - - MWF LIA	LLL GCA F LAS	LWHS V R Y VP	- - - - - - -	- - - LAIRSP	32
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	1	MKTAYLASLV	LIVSTA YVIR	LIAI LPFFHT	QAGTEKD TKD	GVNL LKIRKS	50
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	33	HRCAMKIGVV	LGSGGH TSEM	LRAITE I PLS	YWLDTRP FYV	VSA TDPH SAS	82
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	51	SKKPLKIFVF	LGSGGH T GEM	IRLLEN Y - Q	DLLLGKSIVY	LGYSDEASRQ	98
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	83	LA S QLE QQR F	ERRVVV Y TIP	RAREVG QSYL	MSTI ITTIR -	- - - AT LACF	126
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	99	RFAHF IK KFG	HCKVKYYEFM	KAREVKAT LL	QSVKTI IGT L	VQSF VH VRI	148
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	127	RF VCT E KPDV	LTNGPGVCV	PVIAAA VCOVA	SCAPWWY GRP	AIVY MESFTC	176
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	149	RFAMCGSPHL	FLLNGPGTCC	-IIISFWLKIM	ELLPPL LGSS	HIVY VESLAR	197
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	177	VSHL SLTGS L	LAPWLADVFT	VHWR ALERAV	ARRRRRG TLV	YVGSETARVIT	226
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	198	INTPSLTGKI	LY-WV VDEFI	VQWQE LRDN Y	LPRSK - - -	WFGILVGS MG	241
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	227	DGAPHRLRS L	AAE QEA YALV	TVGSTKFSSL	VQA VVQPGVC	ATLHQRF GIK	276
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	242	IIEEKALFVT	CGATVPFPKL	VS-CVLSDEF	CQE LIQYGFV	RLLIQFGRNY	290
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	277	R LYV QHGTAE	VVAPPEATLL	PALPMAAGAD	ASHPTQQWSC	GGLL VEA FPY	326
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	291	SSEFEHLVQE	RGGQR E S QK I	PIDQFGCGDT	ARQYVL MN - -	GKLKVIGFDFE	338
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	327	RPC LDAV IRG	-ATLV I THAG	AGTILEGLOA	QRPLVVVPNR	Q - - LMS DHQL	373
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	339	STKMQSII RD	YSDLV I SHAG	TGSILD S LRL	NKP LIV CVND	S - - LMD NHQ	386
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	374	DIAE ALANGG	FLFCVQVAE -	-LAERLP LLD	LTTLRPHGG -	MDAAQLOE AL	420
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	387	QIADKFVELG	YVW SCAP TET	GLIAGL RASQ	TEK LKPFPV S	HNPSFERLLV	436
<i>L. major</i> Alg14-Alg13	421	R L VLTGH S AS	GERAKAD - - -	- - - - -	437		
<i>S. cerevisiae</i> Alg14-Alg13	437	E TI YSGSGRV	GAGAGA GAV T	APLAGTIW	464		

Abbildung 36: Proteinsequenzalignment des *S. cerevisiae* Alg14-Alg13p Fusionsproteins mit dem Homolog aus *Leishmania major*. Das *L. major* Protein wurde ab AS Nr. 211 getrennt. Die letzte AS des Alg14 Homologs ist rot gekennzeichnet. Vor das Alg13 Homolog wurde ein Startmethionin eingefügt, gefolgt von Threonin Nr. 226 (grün).

Die Gene wurden anhand des Proteinsequenzalignments verglichen (Abb. 36). Die Trennung in zwei einzelne Proteine erfolgte bei AS R211. Die DNA Abschnitte, die für *L. major* *ALG14* bzw. *ALG13* codieren, wurden über PCR Reaktion amplifiziert. An das Ende der *ALG14* Sequenz wurde ein Stop Codon angefügt, vor die *ALG13* Sequenz ein Startmethionin. Die so erhaltenen DNA Fragmente wurden in den konstitutiven Expressionsvektor pVT100 kloniert und in Hefezellen mit *ALG13* bzw. *ALG14* unter der Kontrolle eines Galaktose induzierbaren Promotors ($P_{GAL}ALG13$ bzw. $P_{GAL}ALG14$) transformiert. Die Fähigkeit der einzelnen *L. major* Proteine mit *S. cerevisiae* codiertem Alg13p bzw. Alg14p eine aktive GlcNAc Transferase zu bilden, wurde über Wachstumsanalysen auf Medien mit Glukose bzw. Galaktose überprüft.

A *L. major* Alg13p**B *L. major* Alg14p**

* genomisches Gen angeschaltet

‡ genomisches Gen für 24h abgeschalten

Abbildung 37: In vivo Analyse der separierten Gene *L. m. ALG13* und *L. m. ALG14*. Da auf Medium, das Glukose als Kohlenstoffquelle enthält, die Hefezellen nicht wachsen, kann daraus gefolgert werden, dass die einzelnen Gene aus *L. major* das jeweils fehlenden Protein aus *S. cerevisiae* nicht ersetzen, obwohl beide Proteine aus *L. major* zusammen eine aktive GNT bilden.

Abbildung 37 zeigt das Wachstum von Hefezellen die entweder *L. major* Alg13 oder *L. major* Alg14 und das jeweilige Hefegen exprimierten (*) oder reprimierten (‡). Auf Agarplatten mit Galaktose als Kohlenhydratquelle konnten alle $P_{GAL}ALG13$ bzw. $P_{GAL}ALG14$ Hefezellen wachsen. Allerdings war auf Selektivplatten, die Glukose enthielten, kein Unterschied im Wachstum von $P_{GAL}ALG13$ bzw. $P_{GAL}ALG14$ Zellen und Zellen die *L. major* Alg13p (Abb. 37 A) bzw. *L. major* Alg14p (Abb. 37 B) exprimierten zu beobachten. War die genomische Kopie von Alg13p bzw. Alg14p durch 8 stündiges Zwischenwachstum bereits reprimiert, erfolgte kein Wachstum auf Glukosemedium (‡). Zellen, die ohne Vorinkubation in Glukosemedium auf die Glukoseplatten gebracht wurden und deren genomisch Kopie der Gene *ALG13* und *ALG14* noch exprimiert wurde, konnten zunächst anwachsen bevor die Repression der Gene durch Glukose erfolgte (*). *In vivo* zeigte weder *L. major* Alg13p noch *L. major* Alg14p die Komplementation des $P_{GAL}ALG13$ bzw. $P_{GAL}ALG14$ Wachstumsphänotyps.

Die einzelnen *L. major* Proteine Alg13p bzw. Alg14p können also nicht mit den komplementären *S. cerevisiae* Genen interagieren, obwohl beide zusammen auch in Hefe eine aktive GlcNAc

Transferase bilden (Abb. 34). Dieser Befund ist analog zu den humanen homologen Genen. Auch die einzelnen humanen Gene komplementieren in der Hefe nicht.

Das LLO aus *Leishmania major* enthält wie *S. cerevisiae* zwei N-Acetylglukosaminreste über eine Pyrophosphatbindung an Dolichol gebunden (Dol-PP-GlcNAc₂-Man_x). In Hefe katalysiert *ALG7* die Übertragung von N-Acetylglucosaminphosphats auf Dolicholphosphat unter Bildung von Dol-PP-GlcNAc₁. In der NCBI Datenbank sind keine homologen Proteine zu dem Hefelocus *ALG7* in *Leishmania major* hinterlegt, die für die Katalyse dieser Reaktion in Frage kommen würden. Eine Erklärung, weshalb in *L. major* dieses Enzym, im Gegensatz zu Hefe und Höheren Eukaryoten, aus einer Polypeptidkette besteht, könnte sein, dass das Enzym aus *L. major* beide N-Acetylglucosaminreste überträgt. Da auch Alg7p in *S. cerevisiae* ein essentielles Protein ist, wurde dies mit einem Hefestamm mit dem Galaktose induzierbaren Promotor vor *ALG7* untersucht. Die *in vivo* Aktivität wurde analog zu den vorherigen Versuchen über das Wachstum auf Medium mit Glukose überprüft. Als Kontrolle diente ein Hefestamm $P_{GAL}ALG13/P_{GAL}ALG14$ mit dem *L. major* Alg14-Alg13 Homolog, da die GNT durch dieses Konstrukt codiert wird.

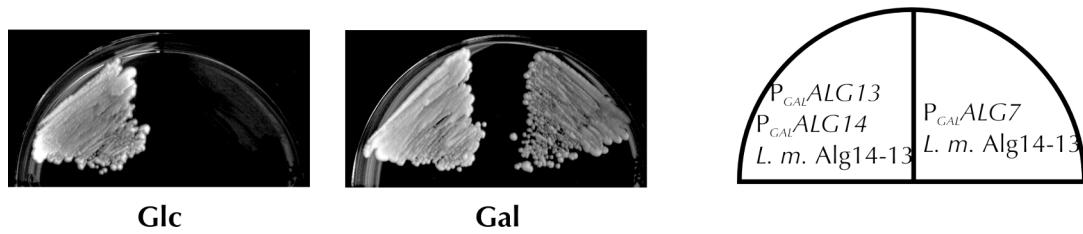


Abbildung 38: Komplementationstest von *S. cerevisiae* *ALG7* durch *L. major* *ALG14-ALG13* im Hefestamm $P_{GAL}ALG7$. *L. major* Alg14-Alg13 komplementiert den *S. cerevisiae* $\Delta alg7$ Phänotyp nicht.

In Abbildung 38 ist das Wachstum von Hefezellen gezeigt, bei denen *ALG7* reprimiert wurde und die *L. m. ALG14-ALG13* exprimierten. Die Vermutung, dass Alg14-Alg13p aus *Leishmania major* auch den ersten N-Acetylglukosaminrest überträgt, konnte nicht bestätigt werden, da $P_{GAL}ALG7$ Zellen mit *L. major* Alg14-Alg13p auf Glukosemedium nicht wachsen können. Damit konnte die vorher geäußerte Vermutung, dass *L. major* Alg14-Alg13p eventuell sowohl GNT- als auch GPT- (N-Acetylglukosaminphosphattransferase) aktivität haben könnte, nicht bestätigt werden.

3. Diskussion

3.1 Das Dimer Alg13p/Alg14p katalysiert die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂

Der Aufbau des lipidgebundenen Oligosaccharids und die dafür nötigen Enzyme sind von Hefe bis zum Menschen hoch konserviert. Innerhalb der Synthese des lipidgebundenen Oligosaccharids ist die in dieser Arbeit charakterisierte UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc₁ GlcNAc Transferase aus *S. cerevisiae* das einzige Enzym das aus zwei getrennten Proteinen aufgebaut ist und nur als Dimer funktionell ist. Alle anderen Transferasen dieses Reaktionsweges bestehen aus einer Polypeptidkette.

Zur Identifizierung von Alg13p/Alg14p in *S. cerevisiae* führten Sequenzvergleiche vor allem mit der GlcNAc Transferase MurG aus *E. coli*. MurG ist eine Glycosyltransferase aus der GT Familie 28 und gehört damit – wie Alg13p – der Glycosyltransferase Superfamilie B (GT-B) an. Mit 9 % Identität zu dem *S. cerevisiae* Alg14-Alg13p Fusionsprotein können mehrere konservierte Bereiche ermittelt werden, die möglicherweise an der Substratbindung von UDP-GlcNAc beteiligt sind (Abb. 39). Aus Strukturanalysen von MurG ist bekannt, dass die Aminosäuren A264, Q288, Q289 mit Hydroxylgruppen des N-Acetylglukosamin interagieren. L265 und T266 treten mit einem Sauerstoffatom aus der Phosphatgruppe in Verbindung und E269 ist mit Hydroxylgruppen aus der Ribose assoziiert [90]. Die Substratbindung erfolgt im C-terminalen Bereich des Enzyms und hat keine Auswirkungen auf die Konformation des C-Terminus. Die Interaktion mit Uracil erfolgt in einer taschenartigen Struktur, bei der einerseits die Verbindung des N- und C-terminalen Bereichs, aber auch der GGS Loop von Bedeutung sind. F244 verändert nach erfolgter Substratbindung seine Lage, kommt schließlich über dem Uracil Ring zu liegen und bedeckt die Bindetasche. Ähnliche Mechanismen sind auch für andere Glycosyltransferasen bekannt und es wird postuliert, dass es sich möglicherweise um eine konservierte Konformationsänderung nach erfolgter Bindung unter den Mitgliedern der Glycosyltransferase Superfamilie B handelt.

Einige Eigenschaften, die für MurG gezeigt sind, können auch für *S. cerevisiae* Alg13p/Alg14p postuliert werden. Die UDP-GlcNAc Bindung erfolgt durch Alg13p. Für die Enzymaktivität sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beide Proteine nötig, da möglicherweise auch hier die Proteinstruktur, welche die Interaktion von Alg13p und Alg14p gewährleistet, an der Bindung von Uracil beteiligt ist.

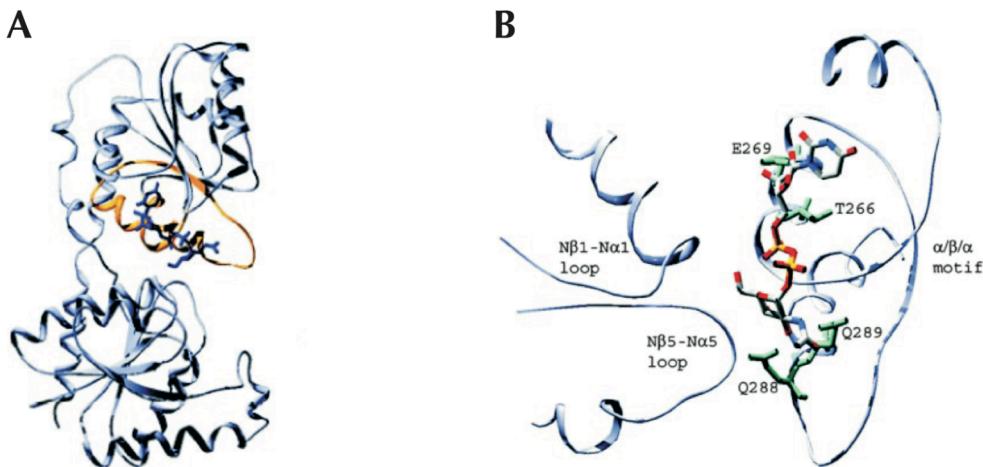


Abbildung 39: Gesamtstruktur (A) und Detailstruktur (B) von MurG mit gebundenem UDP-GlcNAc.
Die in (B) dargestellte Struktur entspricht der gelb gekennzeichneten Struktur in (A). Aus [90]

Alle unter 2.2 und 2.3 beschriebenen Experimente lassen erkennen, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beide Proteine nötig sind, um ein aktives Enzym zu bilden. *In vivo* Analysen der Glykoproteine CPY und Wbpl zeigen unvollständige Glykosylierung wenn Alg13p bzw. Alg14p nicht exprimiert werden. Bei der *in vivo* Markierung der lipidgebundenen Oligosaccharide von Hefezellen mit [³H]-Glukosamin kommt es zu einer Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc₁ wenn Alg13p oder Alg14p fehlen. Andere Reaktionen, wie die Bildung von GPI-GlcNAc, sind unbeeinflusst (Abb. 9). Bei *in vitro* Versuchen mit Mikrosomensolubilisat aus Hefezellen, die nur Alg13p oder Alg14p exprimieren, kann ebenfalls keine Übertragung eines GlcNAc-Restes auf Dol-PP-GlcNAc₁ beobachtet werden.

Die ungewöhnlich starke Interaktion von Alg13p mit Alg14p konnte nicht vollständig geklärt werden. Zusammenfassend sind jedoch einige Eckdaten gesichert.

Die **physikalische Interaktion** von Alg13p und Alg14p konnte mit Hilfe von epitopmarkierten Varianten der beiden Proteine durch Co-Immunpräzipitation gezeigt werden (Abb. 8).

Die **Membranbindung von Alg13p** ist abhängig von der Expression von Alg14p. Bei Repression von *ALG14* ist die dominante Population von Alg13p cytosolisch lokalisiert, die membrangebundene Fraktion kaum mehr vorhanden (Abb. 11).

Heterolog in *E. coli* exprimierte *S. cerevisiae* Alg13p interagiert mit Alg14p und kann *in vitro* eine aktive N-Acetylglukosamintransferase bilden (Abb. 20). Dieser Umstand, zusammen mit dem Befund, dass keine Modifikationen von Alg13p (wie z. B. Phosphorylierung, O-GlcNAc-Modifikation) nachgewiesen werden konnten, welche die cytosolische Fraktion von der membrangebundenen unterscheidet, sprechen sehr dafür, dass es keiner speziellen Modifikation bedarf, um cytosolisch lokalisiertes Alg13p in die membrangebunden Form zu überführen. Ein

sensitiverer Versuch, wie zum Beispiel die Markierung mit radioaktivem Phosphat, wurde noch nicht unternommen. Allerdings würde die mögliche Phosphorylierung voraussetzen, dass in *E. coli* eine Kinase existiert, die auch dort die Phosphorylierung gewährleistet, da durch Zugabe von *E. coli* Alg13p^{His} zu solubilisiertem Alg14p vollständiger Umsatz erfolgt (Abb. 20 Spur 4). Der geringere Umsatz in einem Immunpräzipitat von Alg13p^{His} im Vergleich zu Mikrosomensolubilisat ist nicht weiter erstaunlich. Zum ersten verläuft auch im Immunpräzipitat von *S. cerevisiae* Alg13p^{ZZ} die Reaktion langsamer als im Mikrosomensolubilisat. Außerdem kann die Gesamtmenge des an die Matrix gebundenen Proteins nicht exakt bestimmt werden und die Aktivität des Dimers könnte durch die Bindung an die Matrix beeinflusst werden.

Die **Interaktionsdomäne** von Alg14p mit Alg13p liegt innerhalb der N-terminalen Hälfte zwischen AS 1-117 von Alg14p, da auch ein C-terminal verkürztes Konstrukt, das nur aus 117 statt 237 Aminosäuren besteht, Alg13p bindet.

3.2 Die Beteiligung von Alg13p an der Substratbindung

Hilfreich für die funktionelle Untersuchung von *ALG13* und *ALG14* war vorwiegend der Sequenzvergleich mit anderen N-Acetylglukosamintransferasen wie dem MurG Gen aus *E. coli*. Dieses Enzym ist für die sequenzbasierten Untersuchungen besonders geeignet, da anhand der bereits vorhandenen Röntgenstruktur die Proteinsequenz mit dem dreidimensionalen Aufbau des Proteins gut in Verbindung gebracht werden kann. Erstaunlich ist aber, dass die meisten homologen Proteine zu *ALG13/ALG14* aus zwei getrennten Proteinen bestehen, wohingegen das MurG Protein und *L. major* Alg14-Alg13p aus einer Polypeptidkette aufgebaut ist. Anhand des Sequenzvergleichs von MurG und Alg13p ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die UDP-GlcNAc Bindestelle im *ALG13* Genprodukt liegt. Misst man dem Aufbau der GNT aus zwei Proteinen Bedeutung für die Enzymaktivität bei, wäre ein Argument, dass Alg13p in löslicher Form besser geeignet ist in höherem Umfang cytoplasmatisch lokalisiertes UDP-GlcNAc zu binden als ein membrangebundenes Enzym.

In im Ergebnisteil nicht dargestellten Experimenten wurde der Versuch unternommen, die Bindung von Alg13p an UDP zu zeigen. Laut Untersuchungen des Dolicholsyntheseweges von Sharma et al. ist die GNT durch UDP inhibierbar [88]. Infolgedessen wurde die Bindung von Alg13p an eine UDP-Matrix (Fraktogel) untersucht. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgte durch epitopmarkiertes Alg13p^{ZZ} mittels *Western Blot* Analyse. Dieser Ansatz führte allerdings nicht zu einem eindeutigen Ergebnis, so dass letztlich keine Aussage gemacht werden konnte, ob Alg13p tatsächlich UDP bindet.

Deshalb wurde ein indirekter Ansatz gewählt, indem die potentiell für die UDP-GlcNAc Bindung verantwortlichen Aminosäuren verändert wurden. Wie in Abbildung 22 dargestellt, scheint die

negative Ladung der Aminosäure D125 (*S. cerevisiae* Alg13p) bzw. E269 (*E. coli* MurG) (oder E353 in *L. major* Alg14-13p) Aspartat bzw. Glutamat für die Aktivität des Enzyms von entscheidender Bedeutung zu sein.

In MurG ist gezeigt, dass Glutamat E269 mit Hydroxylgruppen aus einem Sauerstoffatom aus der Phosphatbindung in Verbindung tritt. Aus der Röntgenstrukturanalyse von MurG geht hervor, dass dieses Glutamat direkt an der Bindung von UDP beteiligt ist und für die Diskriminierung von TDP als Substrat verantwortlich ist [89, 90]. Auch für andere Glykosyltransferasen, insbesondere der GT-A Superfamilie, wird die Bedeutung eines konservierten DXD Motifs beschrieben. In diesem Falle allerdings liegt die Funktion eher in der Bindung zweiwertiger Kationen [82].

Die Ergebnisse aus der Mutationsanalyse von *S. cerevisiae* Alg13p legen nahe, dass auch hier die AS D125 an der Substratbindung beteiligt sein könnte. Da das so veränderte Alg13p^{ZZ} in der *Western Blot* Analyse auch in der Membranfraktion gefunden wurde (Abb. 22 C), kann ausgeschlossen werden, dass die Substratbindung von UDP-GlcNAc für die Interaktion von Alg13p mit Alg14p verantwortlich ist. Auch in der Röntgenstruktur von MurG wird keine Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne nach Substratbindung gefunden [90].

Die anderen Aminosäureaustausche (Q75A, H117A, K131A, H146A) hatten weder Auswirkung auf die Enzymaktivität, noch war die Bindung mit Alg14p beeinflusst. Möglicherweise genügt nicht der Austausch von einzelnen Aminosäuren, sondern ganze Bereiche müssten verändert werden. In MurG führt der Austausch von E269A zu einer Erhöhung des K_m Wertes für das Substrat UDP-GlcNAc, aber nicht zur vollständigen Inaktivität des Enzyms [90].

Die funktionelle Analyse des Alg14-Alg13p Fusionskonstrukts führte zu dem Ergebnis, dass die cytosolische Fraktion von Alg13 für das Wachstum von *S. cerevisiae* nicht essentiell ist.

Hefezellen mit ausschließlich membrangebundener Fraktion von Alg13p wachsen über mehrere Generationen unter Laborbedingungen in Minimalmedium weder langsamer noch schlechter als diejenigen Hefezellen mit der löslichen Fraktion von Alg13p. Jedoch kann die Existenz einer nicht essentiellen Funktion nicht ausgeschlossen werden.

E. coli und *Leishmania major* besitzen zu Alg13/Alg14 homologe Proteine die aus einer Polypeptidkette aufgebaut sind. Homologievergleiche zeigen, dass die GNT aus *L. major* größere Homologie (22 %) zu *S. cerevisiae* Alg13/Alg14 hat, als zu dem Enzym aus *E. coli* (9 %).

Erstaunlicherweise hat aber das *Leishmania* Enzym bezüglich Alg13p größere Ähnlichkeit mit dem humanen Homolog von Alg13p als mit dem Hefeprotein. Daraus resultiert, dass das Vorliegen der GNT in zwei getrennten Proteinen evolutionär nicht unbedingt eine Weiterentwicklung sein muss, sondern vielleicht als eine weitere Variante verwirklicht wurde. Zum einen ein Enzym aus einer Polypeptidkette mit einer zwei Domänen Struktur und zum anderen zwei getrennte Proteine die als Dimer ein funktionelles Enzym bilden.

A Homologievergleich

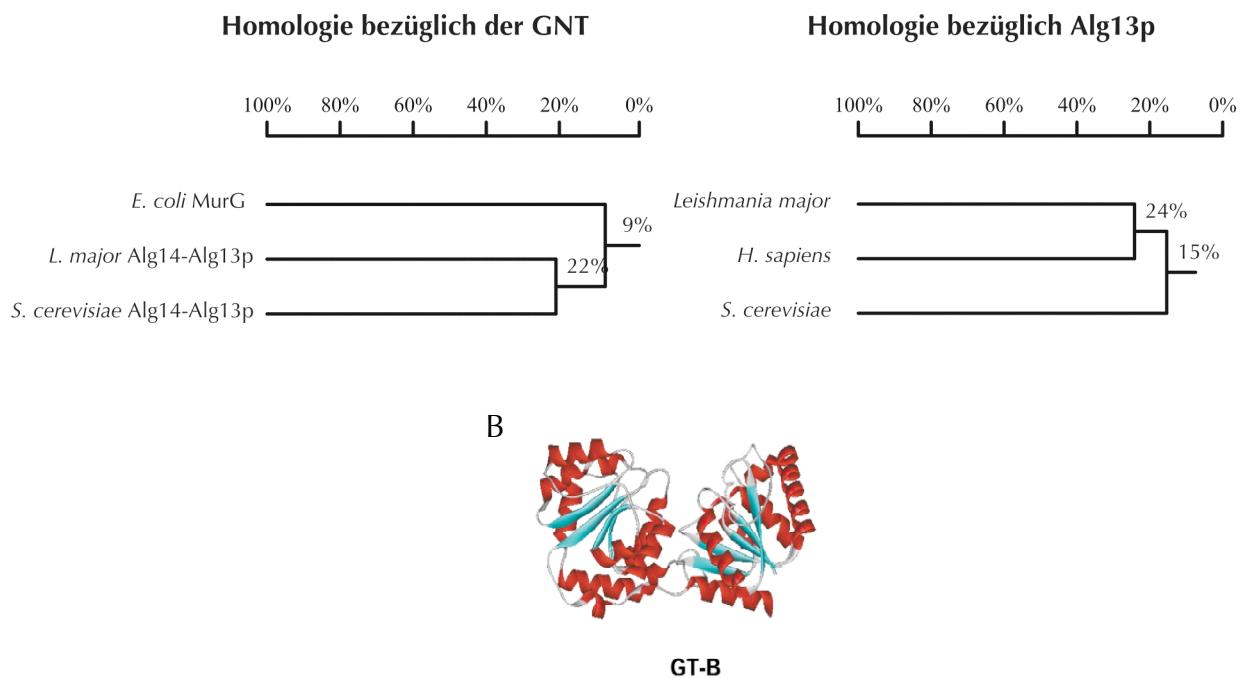


Abbildung 40: Homologievergleich (A) der Alg13/Alg14 homologen Proteine aus *E. coli*, Hefe, Leishmania und Mensch. Die potentielle Struktur von Glykosyltransferasen der GT-B Familie zeigt (B) [79].

Die Existenz der *O*-GlcNAc Transferase bzw. der *O*-GlcNAc Modifikation konnte in *S. cerevisiae* nicht belegt werden. In der Literatur wird die OGT, bzw. die *O*-GlcNAc Modifikation in Eukaryoten als essentiell beschrieben [18, 19]. Allerdings wird die Existenz dieser Modifikation in *S. cerevisiae* zwar postuliert, konnte bis jetzt aber noch nicht experimentell gezeigt werden.

3.3 Analyse der Membrantopologie und essentieller Aminosäuren von *ALG14*

Um die Proteindomänen zu identifizieren, die für die Proteininteraktion mit Alg13p in Frage kommen, war es zunächst nötig, die Membrantopologie von Alg14p zu klären. Da es sich in dieser Hinsicht um ein noch völlig uncharakterisiertes Protein handelte und die ER Lokalisation und Membranspanne lediglich von entsprechenden Vorhersageprogrammen postuliert wurden, wurde die Membrantopologie mit Hilfe von Fusionskonstrukten aufgeklärt.

Die Ergebnisse zeigten, dass nur der hydrophobe Bereich von AS 9-30 als Transmembranspanne genutzt wird und so Alg14p am N-terminalen Ende in der Membran verankert ist. Der Großteil des Proteins ist im Cytoplasma lokalisiert.

Der grundlegende Gedanke, der zur Durchführung der Zufallsmutagenese führte, war das Auffinden von Aminosäuren, die für die Interaktion mit Alg13p verantwortlich sind. Das Alg14 Protein aus *S. cerevisiae* und das humane Homolog teilen über das gesamte Protein hoch konservierte Bereiche (⁶²GSGGHT⁶⁷, ¹⁶²NGPGTC¹⁶⁷, ¹⁸⁹IVYVES¹⁹⁴ vgl. Abb. 26) und es können sowohl hinsichtlich der Aminosäuresequenz als auch bezüglich des Hydropathieplots große Ähnlichkeit mit dem Hefeprotein festgestellt werden. Dennoch scheint es in der Proteinstruktur Unterschiede zu geben, die eine Interaktion von *hAlg14p* mit *S. cerevisiae* Alg13p verhindern. Durch Co-Immunpräzipitation von *S. cerevisiae* Alg13 mit *hAlg14* konnte jedoch gezeigt werden, dass das humane Homolog von Alg14p nicht, oder nur schwach, mit Alg13p aus Hefe interagiert (Abb. 25), wohingegen aber *hAlg13p* in der Membranfraktion lokalisiert ist, folglich also mit *S. cerevisiae* Alg14p interagierten muss (Abb. 24 A).

Die daraus geschlossene Vermutung, dass die Interaktion von Alg13p mit Alg14p eventuell an spezielle Aminosäuren gekoppelt ist, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint die gesamte Struktur des N-terminalen Bereichs von Alg14p für die Interaktion mit Alg13p von Bedeutung zu sein, da auch verkürztes Alg14p mit nur 117 statt 237 Aminosäuren in der Lage ist Alg13p zu binden.

Bei der zufälligen Mutagenese von *ALG14* wurden Aminosäureaustausche gefunden, die in drei Bereiche eingeteilt werden konnten. Zum einen die hydrophobe Domäne am N-terminalen Beginn des Proteins, in den hoch konservierten Bereichen ⁶²GSGGHT⁶⁷ und ¹⁶²NGPGTC¹⁶⁷ und der C-terminale Bereich des Proteins ab AS 188 (Abb. 33).

Von den insgesamt 7 Klonen wurden zwei Klone mit nur einem Aminosäureaustausch gefunden. Die restlichen 5 haben zwischen zwei und drei, zum Teil identische Austausche. Da der Beitrag

zur Inaktivität von Alg14p bei mehreren Mutationen durchaus unterschiedlich ist, wird im Folgenden die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Enzymaktivität näher erläutert.

Im Klon Nr. 4 der Zufallsmutagenese tritt nur eine Mutation H66Y im konservierten Bereich ⁶²GSGGHT⁶⁷ auf, so dass die positive Ladung des Histidinrests von Bedeutung zu sein scheint. Auch Klon Nr. 33 enthält nur eine Mutation – T204I. Die Wachstumsanalyse dieses Klons zeigt das gleiche Ergebnis wie das der anderen Klone, aber der Glykosylierungsphänotyp der CPY ist schwächer ausgeprägt als beispielsweise bei Klon Nr. 4 (Abb. 32).

Ferner scheint sich dieser Aminosäureaustausch auf die Enzymaktivität von Alg14p weniger gravierend auszuwirken, als es bei anderen Klonen der Fall ist. Die Mutation T204I tritt auch im Klon Nr. 7 auf. Der zweite Austausch in der Aminosäuresequenz des Klon Nr. 7 wird ebenfalls zweimal gefunden und betrifft AS Nr. 196 wo Alanin gegen Serin ausgetauscht wird, was in Verbindung mit T205I zu einer starken Unterglykosylierung der CPY führt. Klon 12 zeigt ebenfalls einen Austausch der AS Nr. 196 und zwar gegen Glutamat. Die Unterglykosylierung dieses Klons ist vergleichbar mit der wie sie bei Klon Nr. 33 zu beobachten ist und wirkt sich weniger stark aus als bei den anderen Mutationen.

Klon 12 hat insgesamt 3 Aminosäureaustausche (M178I, A196E und R230S), die im Wachstum der Hefezellen letal sind, sich aber im Glykosylierungsstatus der CPY nur moderat auswirken.

Im hoch konservieren Bereich ⁶²GSGGHT⁶⁷ wurden bei der Analyse der Zufallsmutagenese zwei Aminosäureaustausche gefunden. Zum einen der schon erwähnte Austausch von Klon Nr. 4 H66Y und G65D (Klon Nr. 13). Bei G65D wird ein Glycin innerhalb eines glycinreichen Motivs, das möglicherweise an der Ausbildung des *Rossmann fold* [84] beteiligt ist, durch Aspartat ausgetauscht. Die zweite Mutation dieses Klons liegt im N-terminalen Bereich von Alg14p im Übergang in die Transmembranspanne des Proteins (V10E). Die zwei Klone, die Mutationen im konservierten Bereich ¹⁶²NGPGTC¹⁶⁷ tragen, sind Klon Nr. 10 (G163E) und Nr. 15 (C167W). Beide Aminosäuresequenzen tragen jeweils noch einen weiteren Austausch. Klon Nr. 10 am C-terminalen Ende des Proteins (I236L) und Nr. 15 im N-terminalen Bereich (S8T).

Sowohl Isoleucin gegen Leucin, als auch Serin gegen Threonin, haben vermutlich keine so starken Auswirkungen auf die Proteinstruktur, dass dies zur Inaktivierung des Enzyms führen müsste. Der Austausch dieser Aminosäuren I236L und S8T allein hätte somit wahrscheinlich keine Auswirkung auf die Enzymaktivität der GNT.

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass die Mutationen in der Transmembranspanne vermutlich weniger gravierend, oder nur in Verbindung mit anderen Aminosäureaustauschen, von Bedeutung sind. Die Proteinsequenz von Nr. 24 hat ausschließlich Aminosäureaustausche innerhalb der Transmembranspanne von Alg14p, die, wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, nicht zu einer verringerten Enzymaktivität führen (L9V, V13A). Ein negativer Einfluss von S8T in Nr. 15

kann, da es sich um einen konservativen Austausch handelt, ebenfalls bezweifelt werden. So kann die Mutation V10E in Nr. 13, als einzige gefundene Mutation mit Bedeutung angesehen werden. Bei AS Nr. 10 geht die Polypeptidkette in den Transmembranbereich über. Daraus ergibt sich, dass die negative Ladung möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Einlagerung der Polypeptidkette in die Membran oder die Interaktion mit Dolicholphosphat haben könnte.

Mutationen in den konservierten Bereichen ⁶²GSGGHT⁶⁷ und ¹⁶²NGPGTC¹⁶⁷ wirken sich gravierend auf die Enzymaktivität aus. Auch der Einfluss von T205I und A196S auf die GNT Aktivität ist unbestritten. Dagegen scheinen die Austausche M178I, A196E und R230S nur in der Summe von Bedeutung zu sein.

Der Bereich ¹⁸⁹IVYVES¹⁹⁴ wurde durch zielgerichtete Mutagenese untersucht. Für Alg14-191AAp wurde bei der Expression im Wildtyphefestamm eine Besonderheit beobachtet. Die Verdopplungszeit von Wildtyphefzellen, die Alg14-191AAp exprimierten, war von 90 min (ohne Alg14-191AAp) auf mehr als 4 h erhöht. Dieses Ergebnis zeigte bereits, dass es sich bei dieser Mutation um einen gravierenden Eingriff auf die Enzymaktivität handelt. Eine Erklärung für das verlangsamte Wachstum könnte sein, dass Alg14-191AAp mit Alg13p interagiert, damit aus dem Gesamtproteinpool entfernt wird, aber zusammen mit mutiertem Alg14p ein inaktives Enzym bildet. In Abbildung 30 wird der Verlust der Enzymaktivität von Alg14-191AAp und der Erhalt der Bindungsfähigkeit von Alg13p beschrieben. Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die Aminosäuren ¹⁹¹YVE¹⁹³ von Bedeutung für die Enzymaktivität sind, aber neben diesem Bereich noch weitere Strukturen für die GNT Aktivität essentiell sein müssen, da Hefezellen die Alg14-191AAp exprimieren, besser wachsen können als Hefezellen ohne den C-Terminus von Alg14p (Alg14-151p, Abb. 30 B). Dies wird durch die Analyse der Zufallsmutagenese erhärtet. Hier wurde der Bereich ¹⁶²NGPGTC¹⁶⁷, mit den für die Enzymaktivität essentiellen Aminosäuren G164E und C168W gefunden. Eine Zusammenfassung der Topologie, der konservierten Bereiche und essentiellen Aminosäuren ist in Abbildung 41 gegeben.

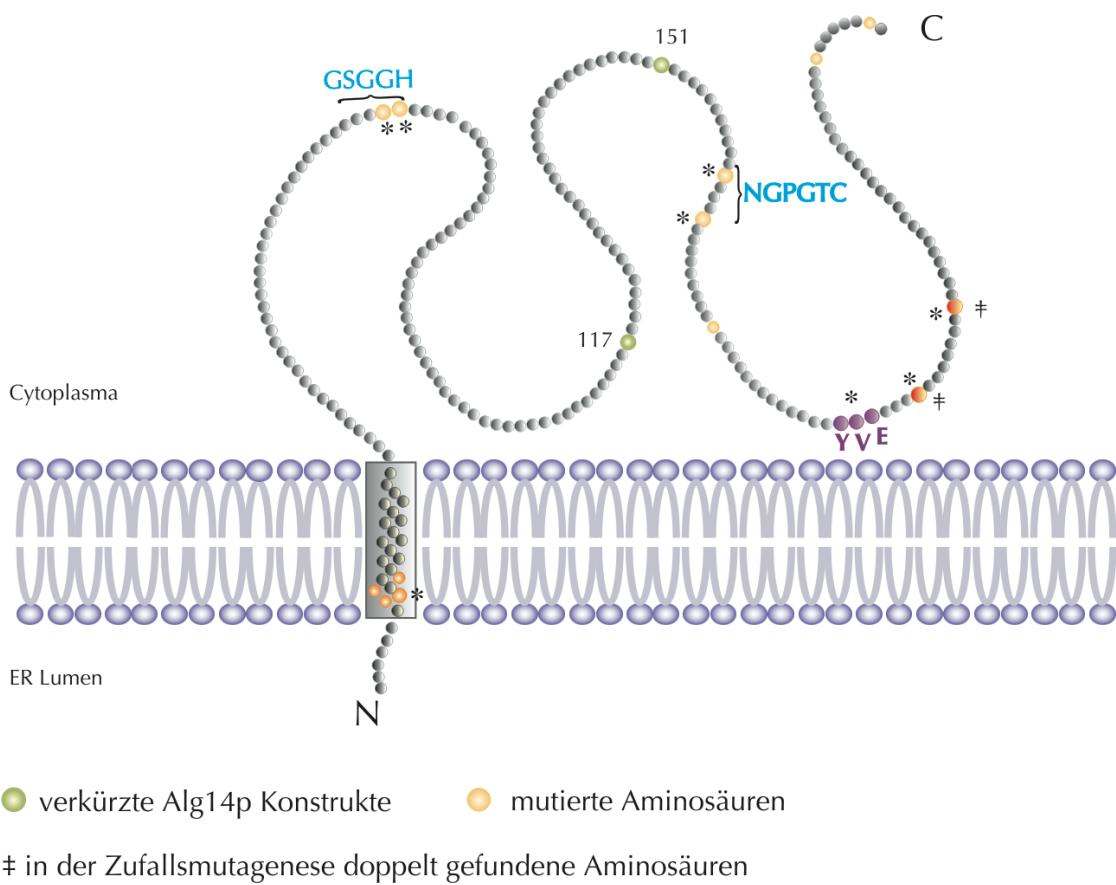


Abbildung 41: Topologiemodell und wichtige Aminosäuren von Alg14p. Essentielle Aminosäuren, die durch die Zufallsmutagenese identifiziert wurden, sind durch orangene Kreise markiert. Mit * gekennzeichnete Aminosäuren sind für die Enzymaktivität von Bedeutung. Der in der zielgerichteten Mutagenese untersuchte Bereich $^{191}\text{YVE}^{193}$ wird durch lila Kreise demonstriert.

3.3 Homologe Proteine zu Alg13p/Alg14p aus anderen eukaryotischen Organismen

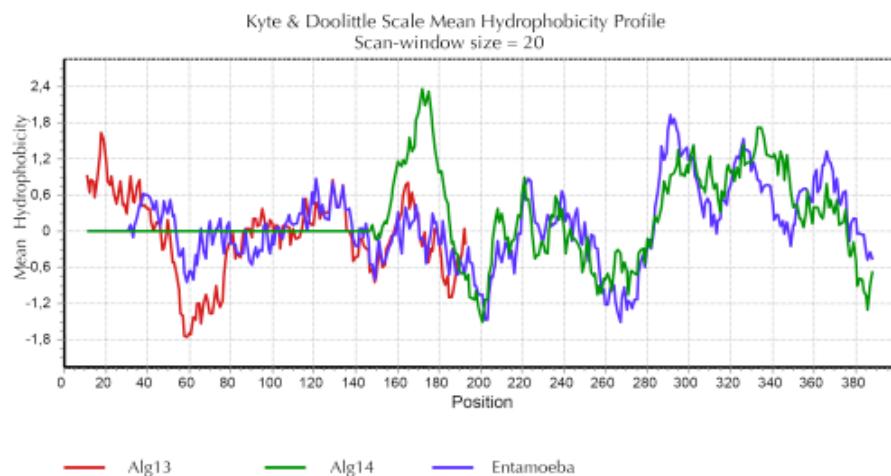
Neben den Untersuchungen von Alg13p und Alg14p aus Bäckerhefe wurden auch homologe Proteine aus anderen Organismen wie *S. pombe*, *L. major* und *H. sapiens* hinsichtlich ihrer GNT Aktivität getestet. Das Alg13p Homolog aus der Spalthefe *S. pombe* bildet mit *S. cerevisiae* Alg14p eine aktive GNT, wohingegen die humanen homologen Proteine, einzeln in *S. cerevisiae* exprimiert, mit den jeweiligen Hefeproteinen keine Enzymaktivität haben (Abb. 24).

Im Trypanosom *Leishmania major* existiert ein Protein mit homologen Bereichen sowohl für Alg13p als auch Alg14p, das in Hefe die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ katalysiert (Abb. 34). Dabei treten mehrere konservierte Bereiche auf, $^{62}\text{GSGGHT}^{67}$, $^{162}\text{NGPGTC}^{167}$, $^{189}\text{IVYVES}^{194}$, $^{202}\text{SLTGKIL}^{208}$, die auch im humanen Homolog existieren (vgl. Abb. 21, 26). Die Proteinsequenz, die homolog zu Alg13p ist, weist im Großen und Ganzen nur einen, dafür jedoch langen konservierten Bereich auf (*L. major* 334-365; *S. cerevisiae* 346-337). Jedoch können die einzelnen homologen Proteine

L. major Alg13p bzw. *L. major* Alg14p die Enzymaktivität in Verbindung mit *S. cerevisiae* Alg13p bzw. *S. cerevisiae* Alg14p nicht bewirken. Es tritt das gleiche Phänomen wie bei den humanen homologen Proteinen auf, dass trotz hoch konservierter Aminosäurebereiche mit den Proteinen aus *S. cerevisiae* keine aktive GNT gebildet werden kann. Werden aber beide Proteine einer Spezies gleichzeitig exprimiert, ist GNT Aktivität in den entsprechenden Zellen messbar. Dies gilt für *L. major* (diese Arbeit) und für die humanen Homologe [91]. Beide Beispiele zeigen, dass das Zusammenwirken der beiden Proteine oder Proteindomänen (für *L. major* Alg14-Alg13) äußerst spezifisch und komplex ist.

In der Einleitung wird ein Protein aus dem zur Ordnung der Amöben gehörenden Organismus *Entamoeba histolytica* erwähnt, das aus einer Polypeptidkette aufgebaut ist, und ebenfalls Homologie zu Alg13p und Alg14p aufweist. Die Anordnung der einzelnen Gene ist hier jedoch nicht *ALG14-ALG13* wie im MurG und *L. major* Alg14-Alg13p sondern Alg13-Alg14 (Abb. 42). Auch der Hydropathieplot weist große Gemeinsamkeiten auf (Abb. 42 B). Dabei ist sehr auffällig, dass der hydrophobe Bereich, der in *S. cerevisiae* Alg14p eine Transmembranspanne bildet, in diesem Protein nicht vorhanden ist (*E. histolytica* AS 160-180). Genau in diesem Bereich sind weder konservierte Aminosäurebereiche bezüglich *S. cerevisiae* Alg13p noch zu *S. cerevisiae* Alg14p auszumachen. Auch im *E. coli* MurG Enzym fehlt diese hydrophobe Domäne (vgl. Abb. 21), die in Höheren Eukaryoten für die gezielte Verankerung in ER verantwortlich ist.

Interessant wäre nun, ob auch dieses Enzym *in vivo*, in *S. cerevisiae* oder auch *in vitro* einen N-Acetylglukosaminrest auf Dol-PP-GlcNAc₁ überträgt. Daneben könnte ein Fusionsprotein in *S. cerevisiae* konstruiert werden, das Alg13 und Alg14 in der gleichen Reihenfolge angeordnet hat wie *E. histolytica* Alg13-Alg14 und hinsichtlich seiner Funktion untersucht werden.

A**B**

<i>S. cerevisiae</i> Alg13	1	M G I I E E K A L F	V T C G A T V P F P	K L V S C V L S D E	F C Q E L I Q Y G F	V R L I I I Q F G R N	50	
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	M K L F V T V G - T	9	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	51	Y S S E F E H L V Q	E R G G Q R E S Q K	I P I D Q F G C G D	T A R Q Y V L M N G	K - L K V I G F D F	99	
<i>Entamoeba histolytica</i>	10	T E F E R L I E T I	N E E D V M K Q L S	Q I G I T E M V V Q	Y G H G K Y I P E S	K A G I T V H S F S	59	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	100	S T K M Q S I I R D	Y S D L V I S H A G	T G S I L D S L R L	N K P L I V C V N D	S L M D N H Q Q Q I	149	
<i>Entamoeba histolytica</i>	60	M K T S I S E D F K	A A D L I I T H A G	A G S V N E A L S V	K K S T I V V I N D	A L M N N H Q T E I	109	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	1	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	150	A D K F V E L G Y V	W S C A P T E T G L	I A G L R A S Q T E	K L K P F P V S H N	P S F E R L L V E T	199	
<i>Entamoeba histolytica</i>	110	A K K L S E L G A V	T Y C P S P S T L K	E L L S H Y I I Q P	G K D I V L K G K E	V D E K I G N L M K	159	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	1	- - - - -	M K T A	Y L A S L V L I V S	T A Y V I R L I A I	L P F F H T Q A G T	E K D T K D G V N L	44
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	200	I Y S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	202	
<i>Entamoeba histolytica</i>	160	E W C G L D K N K D	K E I C V V L G S G	G H T M E M L H V L	H P L D E L C H E V	I K Q F D V I V A E	209	
<i>S. cerevisiae</i> Alg14	45	L K I R K S S K K P	L K I F V F L G S G	G H T G E M I R L L	E N Y Q D L L L G K	S I V Y L G Y S D E	94	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	210	S D N I S S K K L E	G I K S K Y N V H Q	I P R S R K V G Q S	Y F T S I F T T L Y	A I F V C I G M V L	259	
<i>Entamoeba histolytica</i>	95	A S R Q R F A H F I	K K F G H C K V K Y	Y E F M K A R - - E	V K A T L L Q S V K	T I I G T L V Q S F	142	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	260	K I R P E V - - - -	- - - - - L L C N	G P G T C V P V C I	C C W F L N L F Q S	K K T R I I Y L E S	299	
<i>Entamoeba histolytica</i>	143	V H V V R I R F A M	C G S P H L F L L N	G P G T C C I I S F	W L K I M E L L L P	L L G S S H I V Y V	192	
<i>S. cerevisiae</i> Alg13	300	V C R V - - T T L S	L T G K I L K F I A	D I F V I Q W E E L	K P L N R N A T V H	H L F Y A S D N	345	
<i>Entamoeba histolytica</i>	193	E S L A R I N T P S	L T G K I L Y W V V	D E F I V Q W Q E L	R - - - D N Y L P R	S K W F G I L V	237	

Abbildung 42: Proteinalignment (A) und Hydropathieplot (B) von *Entamoeba histolytica* Alg13-Alg14 mit den entsprechenden *S. cerevisiae* Proteinen.

4. Zusammenfassung

Die Protein-N-Glykosylierung ist eine für Wachstum und Entwicklung von Organismen essentielle Modifikation. Sie ist, was die ER lokalisierten Reaktionen betrifft, konserviert von der Hefe *S. cerevisiae* bis zum Menschen [51, 63].

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der bislang unbekannten N-Acetylglukosamintransferase (GNT), die am Aufbau des lipidgebundenen Core-Oligosaccharids Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ beteiligt ist und den zweiten Reaktionsschritt, die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂, katalysiert. Dabei wurde eine neuartige, innerhalb der Glykosylierung bislang einzigartige, Transferase gefunden, die aus zwei Proteinen besteht und nur als Dimer funktionell ist. Das Dimer besteht aus einer membrangebundenen Untereinheit, Alg14p, welche die lösliche Alg13p Komponente an die ER Membran rekrutiert. Alle anderen Mannosyl- und Glukosyltransferasen, sowie die N-Acetylglukosaminphosphattransferase (GPT), bestehen aus nur einer Polypeptidkette.

Die entsprechenden codierenden Gene wurden *in silico* durch Sequenzvergleiche und mit Hilfe von Datenbankrecherchen identifiziert, anschließend isoliert und die abgeleiteten Proteine hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert.

In vivo Untersuchungen zeigten bei Repression der Proteine Alg13 und Alg14 durch Tetracyclin bzw. Galaktose regulierbare Promotoren (P_{TET} , P_{GAL}) die Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc₁ und als Folge die Unterglykosylierung der Glykoproteine CPY und Wbpl. Spezifische *in vitro* Enzymtests ergaben, dass Alg13 und Alg14 nur als Dimer die Übertragung des GlcNAc-Rests von UDP-GlcNAc auf Dol-PP-GlcNAc₁ katalysieren.

Die Membranbindung der löslichen Komponente Alg13p ist abhängig von der Expression des membranständigen Proteins Alg14p. Mit Hilfe von Fusionskonstrukten wurde die Membran-topologie von Alg14p aufgeklärt. Entgegen der Vorhersagen, basierend auf Hydropathieanalysen, die 2-3 Transmembransegmente postulierten, enthält Alg14p nur eine Transmembranspanne am N-Terminus im Bereich der Aminosäuren 10-30. Mit Hilfe von verkürzten Alg14p Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit Alg13p im N-terminalen Bereich bis Aminosäure 117 stattfindet.

Die Interaktion der GNT Untereinheiten sollte durch Mutationsanalysen näher charakterisiert werden. Dabei wurden sowohl für Alg13p als auch für Alg14p für die Enzymaktivität essentielle Aminosäuren identifiziert, die jedoch für die Dimerisierung ohne Bedeutung sind. Der Austausch eines hoch konservierten Aspartats (D125) in Alg13p führt zu einem inaktiven Enzym, wohingegen Mutationen in anderen konservierten Bereichen (¹¹⁴VISHAG¹¹⁹, ¹³¹KPLIV¹³⁵, ¹⁴¹LMDNHQ¹⁴⁶) die Enzymaktivität nicht beeinflussen. Im Gegensatz zu Alg13p, sind die konservierten Aminosäureabschnitte von Alg14p, ¹⁶²NGPXC¹⁶⁶, ¹⁸⁹IVYXES¹⁹⁴ und ²⁰²SLTG²⁰⁵, für die Enzymaktivität entscheidend. Die essentiellen Aminosäuren wurden mittels Zufallsmutagenese und zielgerichteter Mutagenese ermittelt.

Alg13p, heterolog in *E. coli* exprimiert, bildete im *in vitro* Test mit Alg14p ein aktives Enzym. Dadurch kann die Modifikation von Alg13p z. B. durch Phosphorylierung oder O-GlcNAc Modifikation für die Dimerisierung mit Alg14p mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Das Alg13p Homolog aus *S. pombe* ist in *S. cerevisiae* vollständig aktiv. Die Untersuchung der humanen Homologen *hAlg13p* bzw. *hAlg14p* führte zu der Erkenntnis, dass durch die einzeln exprimierten Proteine in Verbindung mit den komplementären Proteinen aus *S. cerevisiae* die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ nicht katalysiert wird. Dies ist auf die fehlende Interaktion der humanen Proteine mit *S. cerevisiae* Alg13p bzw. Alg14p zurückzuführen. Werden jedoch *hAlg13p* und *hAlg14p* in der Bäckerhefe co-exprimiert, wird eine aktive GNT gebildet [91].

Die Suche nach weiteren Homologen führten zu der Entdeckung eines bisher nicht charakterisierten ORFs aus *Leishmania major*. Dieses nur aus einer Polypeptidkette aufgebaute Enzym, ist bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* in der Lage, die Bildung von Dol-PP-GlcNAc₂ zu katalysieren. Wurde der „*ALG14-ALG13*“ ORF aus *L. major* in die Untereinheiten getrennt, war, analog zu den humanen Homologen, mit den jeweils komplementären Hefeproteinen keine GNT Aktivität zu generieren.

Chemikalien und Enzyme

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

Folgende Firmen lieferten:

Amersham LIFE SCIENCE (Braunschweig)

Amplify™-Lösung, [³⁵S]-Methionin, UDP-N-Acetyl-[¹⁴C]-glukosamin, [6-³H]Glukosamin, [2-³H]Mannose Protein A Sepharose CL-4B

J.T.Backer (Deventer)

Acetonitril für HPLC

Bio101 (Vista, USA)

CSM-drop-out-Medien

BioRad (Richmond, USA)

Bromphenolblau, Coomassie "Brilliant Blue" G250

Braun Biotech International (Melsungen)

Glasperlen Ø 0.4-0.6mm

Calbiochem

Nonidet P40 (*protein grade*), G418 Sulfat

Difco (Sparks, USA)

Bacto Agar, Bacto Peptone, Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

Domimed

Fuji Röntgenfilme RX 100

Fermentas (Vilnius, Litauen)

DNA Längenstandards: EcoR I/Hind III geschnittene λ-DNA, 100 bp ladder plus, fast ruler low, medium und high range, IPTG, X-Gal

Fluka Chemie (Buchs)

LiAc, PEG 4000, Ponceau S-Lösung

Heirler Cenovis (Radolfzell)

Magermilchpulver

Invitrogen (San Diego, USA)

TOPO TA PCR cloning kit, blunt TOPO PCR cloning kit

Interchim (France)

Coo Protein Assay Reagent

Macherey-Nagel (Düren)

NucleoBond® PC100 Kit

Millipore

Amicon Ultrafree-MC 0,45µm Durapore- Membran Filter Units, HV-Filter (Porengröße 0,45 µm)

New England Biolabs (Beverly, USA)

Alkalische Phosphatase, BSA, Restriktionsenzyme und -puffer, T4 DNA Ligase

Nikko Chemicals (Japan)

Nikkol BL-8SY

PeqLab (Erlangen)

peqGOLD Universal Agarose, dNTPs

Pierce

SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate, SuperSignal® West Dura Chemiluminiscent Substrate, Triton X-100

Qiagen (Hilden)

Min Elute™ Gel Extraction Kit, Min Elute™ Reaction Cleanup Kit, Ni-NTA Agarose , QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen® One Step RT-RCR Kit, Taq DNA Polymerase

Roche (Mannheim)

Ampicillin, Benzamidin, PMSF, Ethidiumbromid, RNase A

Roth (Karlsruhe)

Acrylamid-/N-,N'-Methylenbisacrylamidlösung (30/0.8%, w/v) für Proteingele, Ethanol p. A., Imidazol, Phenol p.A, Rotiszint® ecoplus, Trichloressigsäure

Seikagaku Kogyo (Tokio, Japan)

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

Serva (Heidelberg)

APS, DTT, Kanamycin, SDS (Na-Salz), TEMED

Sigma (Deisenhofen)

Aminosäuren, Lachssperm-DNA (*single stranded*), Ponceau S, PEG 4000, Triton X-100, Tween 20, anti-mouse IgG HRP (whole molecule)

Stratagene (La Jolla, USA)

Pfu Turbo® Hotstart DNA Polymerase, Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit, GeneMorph® Random mutagenesis Kit

Thermo Hybaid (Ulm)

Synthetische Oligonukleotide

USB (Cleveland, USA)

Tris

Whatman (Maidstone, England)

3MM Chromatographiepapie

Antikörper

MoBiTec

anti-CPY Antikörper: CPY monoclonal antibody

Santa Cruz Biotechnology

anti-HA Antikörper: HA-probe sc-7392 Isotyp IgG_{2a}

anti-myc Antikörper: c-myc sc-40 Isotyp IgG₁

anti-mouse IgG₁-HRP

anti-mouse IgG_{2a}-HRP

Sigma

anti-mouse IgG-HRP, whole molecule

Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive

Spezielle Geräte

Bandelin Sonorex RK 52

Ultraschallbad zur Dispersion von Oligosaccharidlipiden in Kunststoffreaktionsgefäß

Branson Bransonic 220

Ultraschallbad zur Dispersion von Oligosaccharidlipiden in Reagenzgläsern oder Wassermanngläsern

Beckmann Ultranzentrifuge Optima™ TL

für alle Solubilisierungen

Berthold TLC radioanalyzer

Eppendorf Biophotometer

zur Bestimmung der Kulturdichte über OD₆₀₀, sowie der Proteinkonzentration (Bradford-Methode)

Name	Sequenz	Verwendung
YBR070C_ZZKan_5'fw	CCAGTGGCAAGAATTGAGGGACAATTATTACCA AGATCCAAGTGGTCGGCATCCCTGTTAGGAG CA GGGGGGGGTGC	Fusion von <i>ALG14</i> mit Protein A auf genomicscher Ebene
YBR070C_ZZKan_3'rev	GTGATTACTGATTACTTCTGGTAGCAGTGGT AGTTTAATGGGTTGGCCGGATTGAGGTGGACG GT ATCG	Fusion von <i>ALG14</i> mit Protein A auf genomicscher Ebene
YGL047W ZZ Kan fw	CCCAGTTCTCATAACCCGTCAATTGAGGGATTG CTAGTCAAACATATACAGGGAGCAGGGCC GGTGC	Fusion von <i>ALG14</i> mit Protein A/ Hämagglutinin/c-myc auf genomicscher Ebene
YGL047W ZZ Kan rev	ATCCTTACATCTTATATGATAATTGTAATACAGCTAT GAACAACTAGTCTATAGGTCGACCG TATCG	Fusion von <i>ALG13</i> mit Protein A/ Hämagglutinin/c-myc auf genomicscher Ebene
YBR070C_Hind_fw	CCCAAGCTTATGAAAACGGCTACTTGGCC ATTGGTG	Amplifizierung von <i>ALG14</i>
YBR070C_-TAA Bam_rev	CGCGGATCCA ACAAGGATGC CGAACCACTT GGATCTTGGT	Amplifizierung von <i>ALG14</i> ohne Stop Codon Klonierung in pVT100
Alg13_Fse1 fw	gc cgg ccg GGT ATT ATT GAA GAA AAG G	Amplifizierung <i>ALG13</i> ; Klonierung in pET28
Alg13_Asc1 rev	ggc gcg ccc TAG CTG TAT ATA GTT TCA AC	Amplifizierung <i>ALG13</i> ; Klonierung in pET28
Alg13_117 H/A fw	GGTCATATCAGCTGCTGGAACG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_117 H/A rev	CGGTCCAGGCCGATGATGACC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_131 K/A fw	GGTGAATGCTCCGTTGATAG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_131 K/A rev	CTATCAACGGGAATTCAACC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_75 Q/A fw	CCAATTCACGCCCTTGGCTG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_75 Q/A rev	CAGCCAAACGACTCAATTGG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_138 N/A fw	GTTGGTAGCTGATTCTTG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_138 N/A rev	CAAAGAATCCGATACGCCAAC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_130D/A fw	GCTCTATACTAGt TCTCTACGGTG	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_130D/A rev	CAACCGTAGA GAAGCTAGTA TAGAGC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_146 Q/A fw	GGATAACCCACCGCTCAGCAGATAGC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg13_146 Q/A rev	GCTATCTGCTCGAGGTGGTATCC	Mutagenese von <i>ALG13</i>
Alg14_191AAA rev	GGAGTATTAACTTGGCAGCGAagCagCagAACT ATATGGGAGGAACCAAC	Mutagenese von <i>ALG14</i>

OLIGONUCLEOTIDE

Alg14 191AAA fw	GTTGGGTCCTCCATATAGTTgctGctGctTCGCTG	Mutagenese von <i>ALG14</i>
Alg14 197A fw	TATGTAGAACATCGCTGGCAgctATTAATACTCCTAGT CTG	Mutagenese von <i>ALG14</i>
Alg14 197A rev	CAGACTAGGAGTATTAA TagcTGCACGGATTCTA CATG	Mutagenese von <i>ALG14</i>
Alg14 206A fw	ACTCTAGTCTGACCCGAgctATTATAATTGGGT AGT	Mutagenese von <i>ALG14</i>
Alg14 206A rev	CACTACCCAATAATA TagcTCCGGTCAGACTAG GAGT	Mutagenese von <i>ALG14</i>
Alg13 GalP fw	TTTCAGTCGCCAAAAGAGGTTAACAAACGAGTC AGAAGCCAGGCTCTTCCggccagatctgttagttggcc	Fusion von Gal Promotor vor <i>ALG13</i>
Alg13 GalP_2 fw	GCCACCTCGCTCGCATTGACAGTTAAATAC GAAATTCCGAACCCggccagatctgttagttggcc	Fusion von Gal Promotor vor <i>ALG13</i>
Alg13 GalP rev	GTGGCCCCACACGTACAAAAAGAGCCTTCTT CAATAATACCCATTgtgttCAGCTGCTAGTAGTCCGAT CCGG	Fusion von Gal Promotor vor <i>ALG13</i>
Alg14 GalP rev	GTCCGATACCGATGAGCACCAATGACGCCAAGTAG GCCGTTTCATgtatttCAGCTGCTAGTAGTCCGATC CGG	Fusion von Gal Promotor vor <i>ALG14</i>
Alg14 GalP fw	CGAAACTACTCTCTTACAGGTCACTTCTCCTATTG CTCCCAATTACACTGcgccagatctgttagttggcc	Fusion von Gal Promotor vor <i>ALG14</i>
hum Alg13 EcoRI fw	ggaattccATGAAGTGCG TGTTTGTTAC C	Klonierung des humanen <i>ALG13</i> Homologs
hum Alg13 Spel rev	gacttagtgctTTTGTAAATCCAACAACCTTATCC	Klonierung des humanen <i>ALG13</i> Homologs
hum Alg14 Bam fw	CG GGA TCC ATGGTGTGGT TCTCGTCTAGC	Klonierung des humanen <i>ALG14</i> Homologs
hum Alg14 Hind fw	CCC AAG CTT ATGGTGTGGT TCTCGTCTAGC	Klonierung des humanen <i>ALG14</i> Homologs
Leishmania Alg14 Hind fw	ccaaagcttATGGGTTTC TCATTGCTCT TC	Klonierung des einzelnen <i>L. m ALG14</i> Homologs
Leishmania Alg14 Bam rev	cggatcc cta AACGTACACC AGCGTGC	Klonierung des einzelnen <i>L. m ALG14</i> Homologs
Leishmania Alg13 Hind fw	cccaagctt agGCTGGGGAGCAG GAGGCC	Klonierung des einzelnen <i>L. m ALG13</i> Homologs
Leishmania Alg13 Bam rev	cggatcc cta ATCCGCC TTGGCCCTC	Klonierung des einzelnen <i>L. m ALG13</i> Homologs
S.pombe_Alg13_Hind_5'fw	CCCAAGCTTA TGAATCCATT TGTAAACAGTG	Amplifizierung von <i>S.pombe ALG13</i>
S.pombe_Alg13_-TAA_Bam_3'rev	CGGGATCCCC TAGGGACCGTC TTGC	Amplifizierung von <i>S.pombe ALG13</i> ohne Stop
S.pombe_Alg13_-Bam_3'rev	CGGGATCCTT ACCTAGCGAC GTCTTGCG	Amplifizierung von <i>S.pombe ALG13</i> mit Stop

Alg14 454 Bam rev	cggatccGGAAACACACATAGCAAATC	Konstruktion des S. c. Alg14-151Δ Proteins
Alg14 351 Bam rev	cggatccTTAACCTTCC CTAGCTTCA TG	Konstruktion des S. c. Alg14-117Δ Proteins
hum Alg14 449 Bam rev	cggatccAAATCTGGCT TCACCCCTGTG AATTAGG	Konstruktion des hAlg14-150Δ Proteins
hum Alg14 329 Bam rev	cggatccGTATTGGTA TACATGTTAC TAGG	Konstruktion des hAlg14-110Δ Proteins
JS64	CCTTGTTCTTTCTGCAC	Sequenzierung des pVT100

E.coli Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21 [DE3]	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, USA
DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG</i>	BRL™ Grant et al. (1990) [92]
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z ΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
SURE	<i>e14- (McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene

Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
SS328	<i>Mat⁺ ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	Vijayraghavan [93]
SS330	<i>MAT^a ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1</i>	Vijayraghavan [93]
W303-1A	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	Thomas et al. [94]
W303-1B	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	Thomas et al. [94]

Hefestämme mit regulierbaren Promotoren

TetO ₇ <i>ALG13</i> (P _{TET} <i>ALG13</i>)	<i>MAT^a ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 GAL2 LEU2::tTA YGL047W (-50,-1)::loxP-KanMX-loxP-tetO₇</i>	Euroscarf
TetO ₇ <i>ALG14</i> (P _{TET} <i>ALG14</i>)	<i>R1158 - URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i>	Open Biosystems YSC1180
GalP:: <i>ALG13</i> P _{GAL} <i>ALG13</i>	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 (-37, -1)::HIS5-GalP</i>	diese Arbeit
GalP:: <i>ALG14</i> P _{GAL} <i>ALG14</i>	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ALG14 (-116, -1)::HIS5-GalP</i>	diese Arbeit
GalP:: <i>ALG13</i> GalP:: <i>ALG14</i> P _{GAL} <i>ALG13/P_GAL ALG14</i>	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ALG13 (-37, -1)::HIS5-GalP, ALG14 (-116, -1)::KanMX-GalP</i>	diese Arbeit
GalP:: <i>ALG7</i>	<i>Mata ade2 his3-11 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ALG7 (-517, -1)::HIS5-GalP</i>	dieses Labor

Hefestämme mit genomisch codierten epitopmarkierten Genen

TetO ₇ <i>ALG13^{myc}</i>	<i>MAT^a ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 GAL2 LEU2::tTA YGL047W (-50,-1tetO₇), 609::c-mycKanMX</i>	diese Arbeit
TetO ₇ <i>ALG13^{HA}</i>	<i>MAT^a ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 GAL2 LEU2::tTA YGL047W (-50,-1tetO₇), 609::HAKanMX</i>	diese Arbeit
TetO ₇ <i>ALG13^{ZZ}</i>	<i>MAT^a ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 GAL2 LEU2::tTA YGL047W (-50,-1tetO₇), 609::ZZKanMX</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{myc}</i>	<i>Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{HA}</i>	<i>Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{ZZ}</i>	<i>Mata ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{myc}</i>	<i>MAT^a ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{HA}</i>	<i>MAT^a ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1</i>	diese Arbeit
<i>ALG13^{ZZ}</i>	<i>MAT^a ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1</i>	diese Arbeit

Diese Stämme wurden mit den entsprechenden Konstrukten, die jeweils im Ergebnisteil beschrieben wurden, transformiert und so verschiedene Kombinationen aus epitopmarkierten Proteinen erreicht.

Konstruierte Plasmide:

Alle aufgeführten Gene:

S. cerevisiae ALG13, *S. cerevisiae ALG14*, *hALG13*, *hALG14*, *S. pombe Alg13*, *L. major ALG13*, *L. major ALG14*, *L. major ALG14-ALG13*, wurden als *HindIII/BamHI* Fragment in die Vektoren pVT100 bzw. YCplac33 GFP kloniert.

Die Klonierung in Nev Leu bzw YCplac33-NSN erfolgte über den Umweg über pVT100 mit *SphI* (Abb. 43). Die DNA Sequenzen des Promotorbereichs Terminators und des Epitops wurden durch die des Vektors pVT100 ersetzt (PMA1 Promotor wurde gegen ADH1 Promotor ausgetauscht). Die Klonierung in pET28-His₁₀F/A erfolgte mit Fse/Asc Schnittstellen, wobei Fse (GGC CGG CCX) für Gly, Arg, Pro codierte.

Verwendete Vektoren:

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
YCplac33 NSN	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, CEN4, URA3</i>	Gietz und Sugino, 1988 [95]
YCplac33 NSN-GFP -ZZ	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, CEN4, URA3</i>	Gietz und Sugino, 1988, verändert nach Jürgen Stolz, dieses Labor, unveröffentlicht
Nev Leu	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, CEN4, URA3</i>	Sauer und Stolz, 1994 [96]
pET 21	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid	Novagen
pET28-His ₁₀ -(Tev)-F/A	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid	Novagen, verändert durch Olaf Stemmann
pSH47	Zur Expression der cre Rekombinase	Euroscarf, Güldener et al. [97]
pVT100	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid <i>ori, bla, 2μ, URA3</i>	Vernet et al. 1987 [98]
pVT100-Bio -ZZ -GFP	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsplasmid mit den Epitopen BIO, ZZ, GFP <i>ori, bla, 2μ, URA3</i>	[98] Verändert nach Jürgen Stolz
pJK90	<i>ori, bla, SUC2, HIS4</i> Reporter Konstrukt	Kim et al., 2003 [112]
pUC19GalPHis	Klonierungsvektor mit Galaktosepromotor	Pirner und Stolz, 2005 [115]
p9myc	Klonierungsvektor mit 9-fachem <i>c-myc</i> -Epitop	Jungmann und Munro, 1998 [99]
pZZ	Klonierungsvektor mit zwei Domänen des Protein A Epitops	Jungmann und Munro, 1998, verändert durch Jürgen Stolz
pGFP	Klonierungsvektor mit GFP	Jürgen Stolz, unveröffentlicht
pBS	Vektor für Zwischenklonierungen	Stratagene

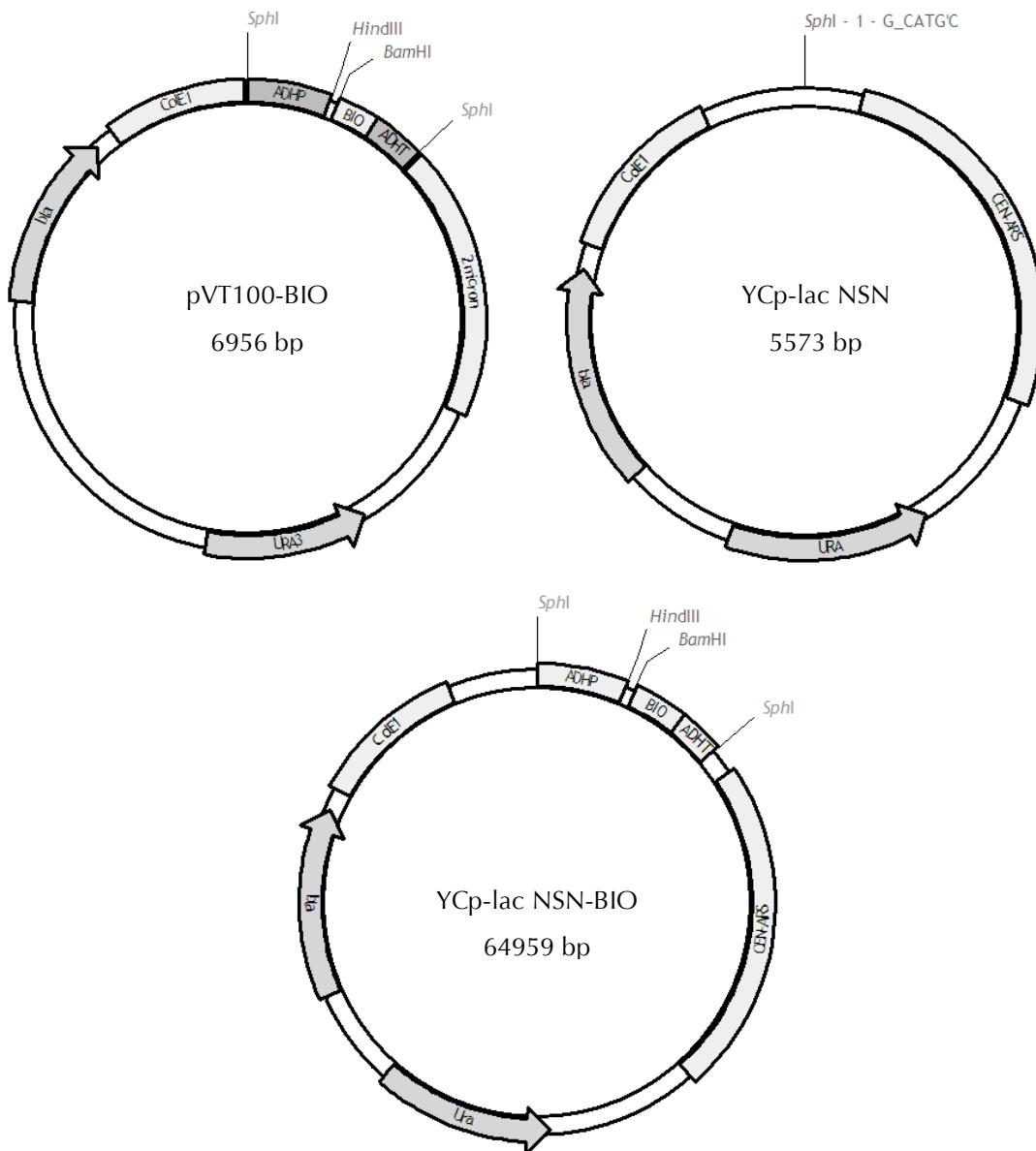


Abbildung 43: Vektorkarten der verwendeten Plasmide pVT100 und YCplacNSN.

Gen	<i>S. cerevisiae</i> <i>ALG13</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ALG14</i>	<i>hALG13</i>	<i>hALG14</i>
Vektor	pVT100-ZZ	pVT100-ZZ	pVT100-ZZ	pVT100- BIO
	pVT100-BIO	pVT100-BIO	pVT100-GFP	pVT100- ZZ
	pVT100-GFP	151 pVT100-BIO	pVT100U	150 pVT100-BIO
	pET 28	117 pVT100-BIO	NevLeu-ZZ	NevLeu-BIO
	<i>ALG13Q75A-ZZ</i> YCplac	151 pVT100-ZZ	NevLeu-BIO	NevLeu-ZZ
	<i>ALG13H117A-ZZ</i> YCplac	117 pVT100-ZZ		
	<i>ALG13K131A-ZZ</i> YCplac	191AAA ZZ pVT100		
	<i>ALG13H146A-ZZ</i> YCplac	191AAA BIO YCplac		
	<i>ALG13D125A-ZZ</i> pVT100	191AAA BIO pVT100		

Fusionskonstrukte:

Die Fusionskonstrukte der *S. cerevisiae* Gene *ALG14-ALG13* wurden folgendermaßen konstuiert. Der Vektor pVT100-*ALG14*-BIO oder ZZ wurden *Bam*HI verdaut, *ALG13* mit *Bam*HI Schnittstellen über PCR amplifiziert und in den linearisierten Vektor, der bereits *ALG14* enthielt, kloniert. In einem zweiten Schritt wurde sowohl das Startmethionin gegen Alanin als auch die *Bam*HI Schnittstelle mutiert (Abb. 44).

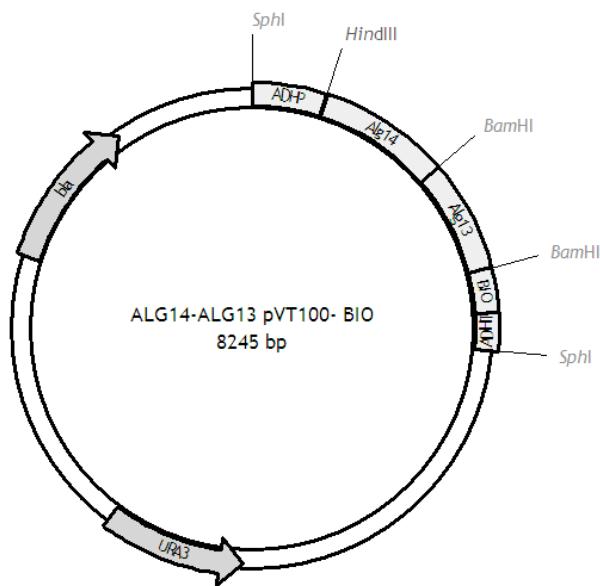


Abbildung 44: Vektorkarte des Fusionskonsstrukts *ALG14-ALG13*-BIO

<i>S. cerevisiae</i> Fusionskonstrukte	<i>Leishmania major</i>
<i>ALG14-ALG13</i> BIO pVT100	<i>ALG13</i> pVT100
<i>ALG14-ALG13</i> ZZ pVT100	<i>ALG14</i> pVT100
<i>ALG14-ALG13</i> M/A BIO pVT100	<i>ALG14-ALG13-ZZ</i> pVT100
<i>ALG14-ALG13</i> M/A GFP Ycplac	<i>ALG14-ALG13</i> -BIO pVT100
<i>ALG14-151-</i> <i>ALG13</i> BIO pVT100	<i>ALG14-ALG13</i> -GFP pVT100
<i>ALG14-151-</i> <i>ALG13-131-117</i> BIO pVT100	<i>ALG14-ALG13</i> pVT100U
<i>ALG14-ALG13-131-117</i> BIO pVT100	
<i>ALG14-ALG13-131-117</i> ZZ pVT100	

6. Methoden

6.1. Anzuchtbedingungen und Medien

6.1.1 Anzuchtbedingungen für *E. coli*

E. coli Kulturen wurden bei 37°C als Flüssigkultur in 2TY Medium oder auf LB Platten mit 1,8 % Agar angezogen.

Medien:

LB Medium	1 % Trypton (w/v)	2TY Medium	1,6 % Trypton (w/v)
	0,5 % Yeast Extrakt (w/v)		1 % Yeast Extract (w/v)
	1 % NaCl (w/v)		0,5 % NaCl (w/v)
	1,8 % Agar (w/v)		

Je nach verwendetem Plasmid und daraus resultierender Resistenz der *E. coli* Zellen wurden Antibiotika zugegeben.

±100 µg/ml Ampicillin bzw. ± 25 µg/ml Kanamycin

6.1.2 Anzuchtbedingungen für *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Kulturen wurden bei 30°C angezogen. Wildtyphefestämme und Hefestämme mit genomisch integrierten Proteininfusionskonstrukten wurden in Vollmedium YEPD kultiviert. Promotorfusionen mit Galaktose induzierbarem Promotor wurden bei Expression des jeweiligen Gens in YEPG (Galaktose) bzw. zur Repression des Gens in YEPD (Glukose) angezogen. Zur Selektion auf Auxotrophiemarker (Uracil oder Leucin) wurde Minimalmedium mit Glukose oder Galaktose verwendet. Die Selektion auf Kanamycin erfolgte mit dem Kanamycinderivat G418 auf Vollmedium. Zur Selektion auf Hefestämme mit defektem *URA3* Gen, wurden die Hefezellen auf Vollmedium mit FOA (5' Fluoro orotic acid, von WAK-CHEMIE MEDICAL GmbH) gebracht. Das *URA3* Genprodukt (Orotidin-5'-phosphat decarboxylase) katalysiert die Umwandlung von Orotidin-5'-phosphat (OMP) in Uridin-monophosphat (UMP). Ist im Medium 5' Fluoro-orotsäure vorhanden, wird diese durch die Enzymaktivität des *URA3* Genprodukts in das zytotoxische 5-Fluorouracil umgewandelt und die *URA3* exprimierenden Hefezellen sterben ab.

Hefevollmedien:

YEPD (Glukose)	1 % Yeast Extrakt (w/v) 2 % Bacto Pepton (w/v) 2 % Glukose (w/v) ± 1,8 % Agar (w/v) ± G418 (266mg/l)	YEPG (Galaktose)	1 % Yeast Extrakt (w/v) 2 % Bacto Pepton (w/v) 2 % Galaktose (w/v) ± 1,8 % Agar (w/v)
-----------------------	---	-------------------------	--

Minimalmedien:

YNB drop-out	0,67 % YNB Yeast Nitrogen Base (w/v) 2 % Glukose /Galaktose (w/v) 0,08 % Complete Suplement Mixture drop-out leu bzw. ura Medium (w/v) ± 1,8 % Agar (w/v)
YNB CAA	0,67 % YNB Yeast Nitrogen Base (w/v) 2 % Glukose / Galaktose (w/v) 0,5 % Casamino Acids (CAA) (w/v) * ± 1,8 % Agar (w/v)

*Bei Hefestämmen, die für Adenin (20 mg/l) und/oder Tryptophan (30 mg/l) heterotroph sind, wurden diese Aminosäuren zusätzlich beigefügt, da diese in CAA nicht ausreichend vorhanden sind.

YEP

Medium ohne Kohlenstoff Quelle zur Markierung von Hefezellen mit radioaktiv markierten Zuckern

1 % Yeast Extract (w/v)
2 % Bacto Pepton (w/v)

FOA Medium

Zur Selektion von Hefestämmen mit defektem *URA3* Gen

1. 0,67 % YNB Yeast Nitrogen Base (w/v)

2 % Glukose (w/v)

0,1 % FOA (w/v)

und die jeweiligen für den Hefestamm nötigen Markeraminosäuren werden steril filtriert.

2. 1,8 % Agar (w/v) in ddH₂O autoklavieren

⇒ beide Lösungen (1. und 2.) mischen und Platten gießen

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Klonierungstechniken und Restriktionsanalysen

Als Grundlage zur Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligasen und Phosphatasen sowie die Herstellung analytischer und präparativer Agarosegele diente die Methodensammlung von SAMBROOK ET AL. (1989) bzw. MANIATIS ET AL. (1982). Mit den Standards für Agarosegele EcoRI/HindIII verdaute λ DNA, 100 bp ladder plus, fast ruler low, medium und high range (alle FERMENTAS) wurden sowohl die Größe als auch die Menge von DNA Fragmenten bestimmt. Alle Verdaue von Vektoren und PCR Fragmenten mit Restriktionsenzymen (NEW ENGLAND BIOLABS) wurden laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Verdaue mit BamHI wurden maximal für 4 h inkubiert. Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN laut Angaben des Herstellers. Ligationen wurden mit T4 DNA Ligase (NEW ENGLAND BIOLABS) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 50 ng Vektor und einem molaren Überschuss an Insert von 1:5 oder 1:3 laut Angaben des Herstellers angesetzt.

Die DNA Sequenz der humanen Gene *ALG13* und *ALG14* wurden über eine RT-PCR mit hRNA aus Fibroblasten mit dem Qiagen® One Step RT-PCR Kit (QIAGEN) amplifiziert und mit Hilfe des TOPO Systems (INVITROGEN) subkloniert.

6.2.2 PCR Reaktionen

Die meisten PCR Produkte wurden mit der *Taq DNA Polymerase* von QIAGEN amplifiziert. Bei Subklonierungen mit dem Vektor pBS wurde die *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* von FINNZYMES verwendet. Alle Reaktionen wurden laut Angaben des Herstellers angesetzt. Bei Amplifikationen von Plasmiden oder genomischer DNA war die Primerkonzentration 0,1 μ M, bei Ansätzen mit ganzen Zellen (Kolonie PCR) 1 μ M. Zur Amplifikation der DNA bei Kolonie PCR wurde die *GoTaq® DNA Polymerase* von PROMEGA verwendet.

6.2.3 Subklonierung in pBS

Sehr kleine PCR Fragmente, wurden nicht direkt verdaut, sondern erst in einen Vektor zwischenkloniert. Dabei wurde der *E. coli* Vektor pBS (STRATAGENE) mit *EcoRV* linearisiert bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ligase (T4, NEB) und PCR Produkt. 50 ng Vektor und 0,5 pmol PCR Produkt wurden mit 400 U T4 Ligase und 20 U *EcoRV* in 100 mM NaCl und 1 x Ligasepuffer in insgesamt 10 μ l 4-5 h bei 22°C inkubiert, die Enzyme 10 min bei 65°C inaktiviert und der noch ungeschnittene Vektor erneut mit 20 U *EcoRV* für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der ganze Ansatz in *E. coli* transformiert und auf Platten die 0,04 mM IPTG und 0,004 % X-Gal

enthalten plattiert. Bei der anschließenden Analyse der Plasmid DNA wurden ausschließlich weiße *E. coli* Kolonien verwendet.

6.2.4 Zielgerichtete Mutagenese

Gezielte Punktmutationen in den Genen *ALG13* und *ALG14* wurden mit Hilfe des *Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (STRATAGENE) eingeführt. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als *Template* dienten Plasmide mit den jeweiligen zu mutierenden Genen, wobei die Primer so gewählt wurden, dass sie die Mutation bereits enthielten. Die PCR Reaktion wurde mit der *Pfu Turbo DNA Polymerase* (STRATAGENE) durchgeführt, die das gesamte Plasmid amplifizierte. Durch anschließenden *DpnI* Verdau wurde das methylierte, unmutierte Ausgangsplasmid eliminiert, so dass bei anschließender Transformation in *E. coli* nur über PCR amplifiziertes Plasmid replizieren kann. Die Überprüfung des Aminosäureaustausches erfolgte über Sequenzierung des betreffenden Gens.

6.2.5 PCR-generierte Zufallsmutagenese

Herstellung des durch zufällige Basenaustausche modifizierten *ALG14* Gens (*mutALG14*)

Die Reaktion bei der das Gen *ALG14* durch zufällige Basenaustausche verändert wurden, erfolgte mit der Taq Polymerase „mutazyme“ aus dem *GeneMorph® Random mutagenesis Kit* von STRATAGENE, die pro Amplifikation mehr falsche Basenpaarungen erlaubt, als die standardmäßig im Labor verwendete *Taq DNA Polymerase*. Das Prinzip hierbei ist, dass über die eingesetzte Menge an *template* DNA und die Anzahl der Zyklen, durch die das Gen vervielfältigt wurde, die Anzahl der Mutationen beeinflusst werden kann.

$$\text{Mutationsfrequenz} = \text{Fehlerrate des Enzyms} \times \text{Anzahl der Duplikationen}$$

Insgesamt wurde die Mutazymreaktion laut Angaben des Herstellers angesetzt.

5 µl 10 x PCR Puffer	Programm:
1 µl <i>ALG14</i> DNA	95°C 2 min
1 µl dNTP Mix	95°C 30 sec
je 125 ng Primer	60°C 30 sec
41 µl H ₂ O	72°C 1 min
1 µl Mutazyme	72°C 10 min
	} 30 x

In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 23 ng der codierenden DNA von *ALG14* eingesetzt. Es wurde das ganze Gen *ALG14* mit den Primern „Alg14 HindIII fw“ und „Alg14 BamHI rev“ mit *HindIII* und *BamHI* Schnittstellen amplifiziert. Die Amplifikation ergab 7 µg PCR Produkt. Das bedeutet, dass das *ALG14* Gen ca. 300-fach vervielfältigt wurde. Laut Angaben des Herstellers entspricht dies einer Mutationsrate von 3 bis 5 Basen/1000 Basen. Das Gen *ALG13* besteht aus

609 bp. Statistisch sollte somit ein *mutALG13* Gen zwischen 1,8 und 3 Basenaustausche enthalten. Das PCR Produkt wurde mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* von QIAGEN aufgereinigt und in den Expressionsvektor pVT100-BIO kloniert.

Klonierung des *mutALG14* in pVT100BIO

Da auf inaktives Protein selektioniert wurde, musste sichergestellt werden, dass sich kein leerer Vektor in der „Genbank“ befindet. Dies wurde durch eine Vektorpräparation erreicht bei der statt mit zwei Enzymen mit drei Enzymen geschnitten wurde. Zwei Schnittstellen (*Hind*III und *Bam*HI) befinden sich in der MCS des Vektors. Mit diesen Schnittstellen sollte das mutierte Gen in den Vektor kloniert werden (Abb. 45). Die dritte Schnittstelle *Spel* befindet sich ca. 2300 bp von der MCS entfernt zwischen der β-Lactamase (bla) und dem Hefeselektionsmarker *URA3*. Die Verdaue *Spel/Hind*III und *Spel/Bam*HI wurden getrennt angesetzt, so dass nur vollständig verdauter Vektor aus dem Gel eluiert wurde. Durch die Trennung der beiden Selektionsmarker konnte ungeschnittener Vektor eliminiert werden. Erfolgte eine Ligation zweier *Spel/Bam*HI Fragmente, fehlte die β-Lactamase auf dem Vektor und die *E. coli* Klone können auf Ampicillin nicht wachsen. Ligierte andererseits zwei *Spel/Hind*III Fragmente fehlte der *URA3* Marker für die Hefeselektion und die entsprechenden Hefen können auf Minimalmedium drop-out Ura nicht wachsen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass bei der letztendlichen Selektion kein leerer Vektor mehr in der Genbank vorhanden ist.

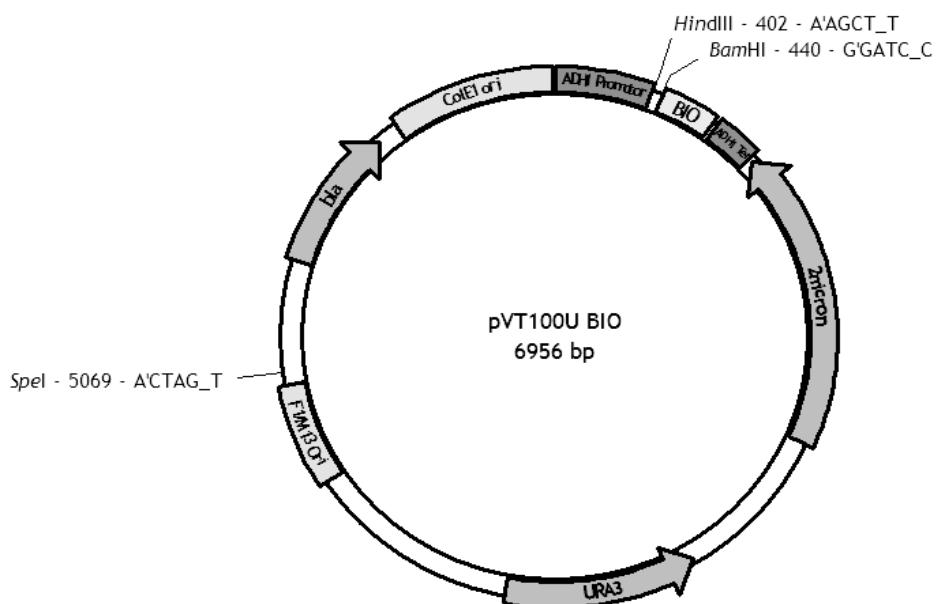


Abbildung 45: Vektorkarte pVT100-BIO mit den verwendeten Restriktionsenzymschnittstellen

Es wurden zwei verschiedene Ligationen angesetzt. Im ersten Fall war das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:1, in zweiten Fall 1:2. Die Ligation erfolgte 4 h bei RT. Anschließend wurde der ganze Ligationsansatz auf jeweils 4 Ansätze aufgeteilt und in *E. coli* (DH10B) transformiert, die insgesamt ca. 20000 Transformanten lieferten. Alle *E. coli* Klone wurden vereinigt und die Plasmide über QIAprep Miniprep Kit isoliert. Diese wurden wiederum in den Hefestamm mit einem Galaktose induzierbaren Promotor vor *ALG14* ($P_{GAL}ALG14$) transformiert. Aus diesen so erhaltenen Hefeklonen wurden 1000 Einzelklone analysiert.

6.2.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Nach Chung et al. [100]

Die stationäre *E. coli* Kultur einer Einzelkolonie wurde 1:100 in 2TY Medium verdünnt und 1-2 h bei 37°C geschüttelt bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5-1 erreicht hatten. Diese Kultur wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1/20 Volumen TSS Medium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

TSS Medium: 85 % LB Medium
 10 % PEG4000
 5 % DMSO
 50 mM MgCl₂

6.2.7 Transformation von *E.coli*

Die wie oben beschrieben hergestellten kompetenten Zellen wurden 30 min auf Eis mit der DNA inkubiert, gefolgt von 45 sec Hitzeschock bei 42°C. Zur Expression der Antibiotikaresistenz folgte ein Zwischenwachstum von 30 min bis 1 h in Vollmedium. Die Selektion erfolgte auf LB Platten mit entsprechendem Selektionsmarker.

6.2.8 Plasmidisolierung aus *E. coli*

STET Methode nach Holmes und Quigley, [101]

Plasmid DNA für Restriktionsanalysen, Transformation von *S. cerevisiae* und Vektorpräparationen wurde mit dieser Methode isoliert. Für Sequenzierungsreaktionen wurde die DNA mit QIAprep™ Spin Miniprep Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers isoliert.

Eine Einzelkolonie wurde in 1-2 ml 2TY Medium mit entsprechendem Antibiotikum für mindestens 8 h kultiviert. Die pelletierten Zellen wurden in 300 µl STET Puffer resuspendiert, 200 µg Lysozym aus einer Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben und 1 min bei RT inkubiert, 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend 15 min bei 20000 × g zentrifugiert. Das Pellet aus Membranen und sonstigen Zellbestandteilen wurde mit einem Zahnröhrchen entfernt und die DNA im Überstand mit 400 µl Isopropanol 10 min bei 20000 × g gefällt. Das DNA Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und 15 min RNase verdaut (TE/RNase 10 µg/ml).

STET Puffer	8 % Saccharose
	50 mM Tris/HCl pH8
	50 mM EDTA
	5 % Triton X-100

6.2.9 Hefetransformation

Nach Schiestl und Gietz [102]

Pro Transformation wurden 10 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmischen Hefekultur (OD₆₀₀ ~1) geerntet, zunächst mit steriles Wasser, dann mit 1 ml 0,1 M TE/LiAc pH 8 gewaschen. Die Zellen wurden in 50 µl 0,1 M TE/LiAc pH 8 resuspendiert, dann das PCR-Produkt (1-10 µg) oder Plasmid (0,5-2 µg), 5 µl Lachsperm DNA (= 55 µg; SIGMA) und 300 µl 40 % PEG 4000 (w/v)/TE/LiAc 0,1M pH 8 zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Hefen wurden 30 min bei 30°C dann 15 min bei 42°C inkubiert.

Die Selektion erfolgte auf Platten mit entsprechendem Selektivmedium. Bei Transformationen mit Kanamycin (G418) als Selektionsmarker erfolgte ein Zwischenwachstum von 3-4 h zur Expression des Resistenzgens.

6.2.10 Isolierung genomischer DNA aus Hefe

Ein abgewandeltes Protokoll von Hoffmann und Winston [103] diente als Grundlage zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe.

70-80 OD₆₀₀ Einheiten einer stationären Hefekultur wurden sedimentiert und mit steriles Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und anschließend 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v) und 0,3 g sterile Glasperlen zu den Zellen gegeben. Durch 4 min vortexen wurden die Zellen aufgeschlossen. Der pH Wert wurde durch Zugabe von 200 µl TE pH 8 erneut eingestellt. Nach Phasentrennung durch 5 min zentrifugieren bei 20000 x g wurde die DNA in der wässrigen Phase abgenommen, mit 1 ml 98 % Ethanol p. a. gefällt und getrocknet, anschließend in 400 µl TE/RNase 75 µg/ml aufgenommen und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 4 M NH₄Ac und 1 ml Ethanol wurde die genomische DNA erneut gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser oder Tris/HCl pH 8 aufgenommen.

Die so gewonnene genomische DNA wurde einerseits dazu verwendet, um Gene aus *S. cerevisiae* zu amplifizieren und in entsprechende Expressionsvektoren zu klonieren. Andererseits wurden die Epitopmarkierungen von Hefegenen und der Austausch von Promotoren so überprüft.

Aufschlusspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 % SDS (w/v)
	2 % Triton-X-100 (v/v)

6.2.11 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Nach Robzyk und Kassir [104]

Hefezellen wurden über Nacht in Selektivmedium bis zur Sättigung kultiviert. 1,5 ml der Kultur wurden geerntet, die Zellen in 100 µl STET Puffer (vgl. 6.2.8) aufgenommen und mit 0,2 g Glasperlen (\varnothing 0,4-0,6mm) im Ribolyzer 3-mal für 20 sec aufgeschlossen, nochmals 100 µl STET zugegeben und für 3 min auf 95°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen, wurde 10 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Die Proteine aus 100 µl des Überstandes wurden mit Ammoniumacetat (50 µl 7,5 M NH₄Ac) mindestens für 1 h gefällt, anschließend die DNA aus 100 µl des so gereinigten Überstandes mit 200 µl Ethanol 10 min pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Zur Amplifikation wurde die so gewonnene Plasmid DNA in *E. coli* retransformiert.

6.2.12 Herstellung Uracil heterotropher Hefestämme nach Fred Winston

Das auf dem Plasmid pMRFW2 enthaltene *S. cerevisiae ura3* Gen weist die stabile Mutation 3-52 auf [105]. Das Plasmid wurde mit Midiprep (Nucleobond) laut Angaben des Herstellers gereinigt und 4 µg DNA zunächst für 4 h *Bam*HI verdaut, nach Pufferwechsel folgte ein *Sma*I Verdau für 16 h. Dadurch wurde das *ura3*-52 Gen aus dem Plasmid isoliert, so dass homologe Rekombination stattfinden kann. Dieser Verdau wurde ohne weitere Aufreinigung mit der oben beschriebenen Lithiumacetat Methode in Hefe transformiert. Jedoch bevor die Hefen auf FOA-Platten gebracht wurden, musste eine Wachstumsphase von mindestens acht Stunden in Vollmedium zwischengeschaltet werden, um die homologe Rekombination mit dem Wildtypgen zu ermöglichen. So konnte ein Hefestamm generiert werden, der für Uracil heterotroph ist.

6.2.13 N-terminale Epitopmarkierung von Proteinen auf genomischer Ebene

Zunächst wurde das entsprechende Epitop (3x Hämagglutinin (HA), 2x Protein A(ZZ) oder 9x c-myc (myc)) mit einem Selektionsmarker (*HIS5* aus *S. pombe* bzw. Kan MX4) mit Oligonukleotiden amplifiziert, die einerseits ca. 20 bp komplementär zu dem zu amplifizierenden PCR Produkt (roter Pfeil), andererseits ca. 50 bp komplementär zu dem zu modifizierenden Gen sind (blau). Vor dem Epitop befindet sich ein 10 Aminosäuren langer Glycin-Alanin (GAGA) Linker, um sowohl die Faltung des Epitops als auch die des Genprodukts zu erleichtern. Dabei ist darauf zu achten, dass der vorwärtsgerichtete Primer so gewählt wird, dass das Stopp-Codon nicht amplifiziert wurde. Das PCR Produkt wurde mit der Lithiumacetat Methode in Hefe transformiert. Dort erfolgte über den 50 bp langen Überhang homologe Rekombination und das PCR Produkt wurde so in das Hefegenom integriert.

zu amplifizierendes DNA Fragment:



nach Integration in das Hefegenom:



Zunächst wurde die Integration des linearen PCR Produkts über Wachstum auf dem jeweiligen Selektivmedium kontrolliert. Über eine PCR Reaktion, bei der die genomische DNA des so modifizierten Hefestamms als Ausgangs-DNA diente und Oligonukleotide verwendet wurden, die einerseits im Gen und andererseits im Terminatorbereich des integrierten PCR Produktes liegen, konnte die homologe Rekombination an der gewünschten Stelle überprüft werden. Ob die Modifikation zu einem Protein führt, das mit dem Epitop exprimiert wird, kann nur mit Hilfe einer *Western Blot* Analyse geklärt werden, bei der entsprechende epitopspezifische Antikörper verwendet werden.

6.2.14 Integration eines Galaktose regulierbaren Promoters in das Hefegenom

Der Galaktose regulierbare Promotor (P_{GAL}) ist an der Regulation des Galaktosestoffwechsels beteiligt und weist neben der Bindestelle für die RNA Polymerase auch eine so genannte UAS (*upstream activating sequence*) auf. An diese Sequenz bindet der Transkriptionsaktivator Gal4p der aus einer DNA Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD), die mit dem Transkriptionskomplex in Kontakt tritt, aufgebaut ist. Die Bindung von Gal4p an die DNA erfolgt in dimerer Form und nur wenn Gal4p Galaktose gebunden hat [113]. Dadurch wird die Expression des nachgeschalteten Gens induziert. Ist ausschließlich Glukose im Medium vorhanden wird die Expression des jeweiligen Gens reprimiert.

Prinzipiell wurde bei der Integration des P_{GAL} genauso verfahren wie bei der oben beschriebenen Integration von N-terminalen Epitopen. In diesem Fall wurde allerdings bei der homologen Rekombination ein Teil des eigenen Promoters des betroffenen Gens entfernt und dafür der Gal Promotor integriert. Zur Selektion diente sowohl KanMX4 als auch das *HIS5* Gen aus *S. pombe*, welches *HIS3* aus *S. cerevisiae* komplementiert.

6.2.15 Generierung eines Fusionskonstruktes von *ALG14* mit *SUC2* und *HIS4*

Die Topologiestudien wurden mit Hilfe der Strategie von Sengstag et al. [106] durchgeführt. Die Studie basiert auf dem Prinzip, dass einerseits das *HIS4* Genprodukt, das die Umwandlung von Histidinol zu Histidin katalysiert, ausschließlich im Cytoplasma aktiv ist und andererseits N-Glykosylierung ausschließlich im ER stattfindet. Mit Hilfe dieser zwei Charakteristika kann die Lokalisation des Fusionskonstrukts im Cytoplasma oder im ER bestimmt werden. *ALG14* wurde mit *HIS4* und einem stark N-glykosylierten Protein, der Invertase (*SUC2*), fusioniert. Um dieses Fusionsprotein im *Western Blot* gut detektieren zu können, ist außerdem das HA Epitop Teil des Konstruktes.

Das Fusionskonstrukt wurde über homologe Rekombination *in vivo* hergestellt [112]. Dazu wurde das *ALG14* Gen mit Oligonukleotiden über PCR amplifiziert, die 30 bp komplementär zu dem Vektor und 20 bp komplementär zu *ALG14* waren. Der Vektor wurde durch *Sma*I Verdau linearisiert. Die Transformation erfolgte mit 2 µg Vektor und 2 µg Insert. Dies entspricht einem molaren Überschuss an Insert von 1:10. Die homologe Rekombination und damit letztlich die Fusion erfolgte nach Aufnahme der DNA in die Hefezellen.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Isolierung von Rohmembranen

Die Isolierung von Membranen aus Hefe erfolgte nach Lehle und Tanner (1974) durch Glasperlenaufschluss in einem Zellhomogenisator (Firma Braun, Melsungen) und anschließender differentieller Zentrifugation. Die Zellen wurden bei OD₆₀₀ 3-6 geerntet, mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen und in Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Menge an Aufschlusspuffer in ml richtet sich nach dem Nassgewicht der Hefezellen in Gramm (Nassgewicht in g = Aufschlusspuffer in ml). Es wurde die 5-fache Menge des Nassgewichts an Glasperlen (\varnothing 0,4-0,6 mm, Roth) zugegeben. Der Aufschluss erfolgte in speziellen Gefäßen der Firma Braun im Zellhomogenisator 3 min unter CO₂ Kühlung. Anschließend wurde das Homogenat über einen Büchnertrichter abgesaugt und die Glasperlen mit Aufschlusspuffer nachgewaschen. Zunächst wurden die großen Zelltrümmer 5 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert, dann die Membranfraktion 30 min bei 48000 x g und 4°C pelletiert. Das Membranpellet wurde mit Aufschlusspuffer gewaschen, nochmals abzentrifugiert, in Membranpuffer (4 OD Einheiten/ μ l Membranpuffer) aufgenommen und der Proteingehalt mit Hilfe des Bradfordtest (Interchim) bestimmt (6.3.4).

Aufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 je 1 mM β -Mercaptoethanol, PMSF, Benzamidin 1 mM MgCl ₂ 5 % Glycerin	Membranpuffer	30 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM DTT 3 mM MgCl ₂ 35 % Glycerin
-------------------------	--	----------------------	--

6.3.2 Membranisolierung im kleinen Maßstab

Rohmembranen für die *Western Blot* Analyse von Proteinen wurden durch Membranisolierung im kleinen Maßstab gewonnen. Dazu wurden 30 OD₆₀₀ Einheiten einer Flüssigkultur mit OD₆₀₀ von 3-6 geerntet und mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Das Pellet wurde in 300 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert, die Zellen mit 1,2 g Glasperlen (\varnothing 0,4-0,6 mm, Roth) versetzt und 3 mal 30 sec im „Fast Prep“ aufgeschlossen. Bei niedrigtouriger Zentrifugation (500 x g; 3 min) wurden noch intakte Zellen abzentrifugiert und anschließend die Membranfraktion durch Zentrifugation 30 min bei 48 000 x g isoliert. Das Membranpellet wurde in Membranpuffer durch pottern resuspendiert und bei -20°C bzw. -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

War bei den nachfolgenden Analysen die genaue Verteilung von cytosolisch lokalisierten und membrangebunden Proteinen bedeutend, wurde die Membranfraktion durch Zentrifugation in der Ultrazentifuge 1 h bei 100 000 x g abgetrennt.

Aufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 je 1 mM β -Mercaptoethanol, PMSF, Benzamidin 1 mM MgCl ₂
-------------------------	---

6.3.3 Alkalische Lyse von Hefezellen

Zur *Western Blot* Analyse des gesamten in der Zelle vorhandenen Proteins wurden die Proben durch alkalische Lyse gewonnen. 10 OD Einheiten einer Hefekultur mit einer OD₆₀₀ von 3-6 wurden geerntet und mit 1 ml H₂O gewaschen. Zunächst wurde das Zellpellet in 150 µl Lysepuffer (1,85 M NaOH; 7,5 % β-Mercaptoethanol) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 50 % Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proteine für 10 min auf Eis gefällt und anschließend bei 4°C und 20 000 × g 10 min sedimentiert. Durch Überschichten mit 1 M Tris wurde der pH Wert wieder auf ca. pH 6-7 gebracht und durch zwei Waschungen mit 0,5 ml kaltem Aceton wurden Reste der TCA entfernt, die bei der SDS-PAGE stören würde.

6.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der isolierten Membranen wurde nach der Methode von Bradford [129] bestimmt. Das Bradfordreagenz stammte von der Firma INTERCHIM. Der Test wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde die Probe 1:20 verdünnt und 5 µl bis 30 µl der verdünnten Probe gemessen. Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer Eichkurve mit definierten BSA Mengen von 2 µg bis 25 µg bestimmt.

6.3.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und *Western Blot* Analyse

6.3.5.1 SDS-PAGE

Die Proteine wurden zunächst über ein SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli und King aufgetrennt [130]. Alle verwendeten Apparaturen stammten von der Firma BIORAD. Der Aufbau des *Blots* (Protean Cell II bzw. III) wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt.

Verwendete Puffer:

1-fach SDS Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 2 % SDS 5 % Glycerin 0,15 M EtSH oder 20 mM DTT 0,02 % Bromphenolblau	Laufpuffer	25 mM Tris/HCl 20 mM Glycin 0,1 % SDS
6-fach SDS Probenpuffer	160 mM Tris/HCl pH 6,8 12 % SDS 27 % Glycerin 460 mM EtSH oder 60 mM DTT 0,06 % Bromphenolblau		

Coomassiefärbung:

Zur Färbung der Proteinbanden mit Coomassie in SDS Polyacrylamidgelen wurde das Gel zunächst in einer Lösung aus 0,035 % (w/v) des Farbstoffs Serva-Blue G (SERVA) in 0,25 % Isopropanol und 0,1 % Essigsäure inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden folgte die Behandlung des Gels in einer Lösung aus 0,1 % Isopropanol und 0,1 % Essigsäure.

Silberfärbung:

Die Silberfärbung von Proteinbanden in SDS Polyacrylamidgelen erfolgte nach einem Protokoll von Blum et al. 1987 [114].

6.3.5.2 *Western Blot* Analyse

Nitrocellulose (BA-S 85, Schleicher und Schuell), Whatmanpapier 3 mm und „Pads“ wurden in Transferpuffer für mindestens 30 min äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei Membranproteinen für 1-2 h bei 150 mA, bzw. 30 min bei 360 mA für lösliche Proteine.

Mit einer Ponceau S Lösung wurde der Standard dokumentiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran in Blockierlösung 30 min inkubiert und anschließend mit Antikörpern für jeweils 1 h dekoriert. Zwischen und nach den Antikörperinkubationen wurde die Membran insgesamt dreimal je 10 min gewaschen. Einmal mit TBST und 1 % Magermilchpulver, gefolgt von zweimal mit TBS.

Transferpuffer	38 mM Glycin 48 mM Tris 0,02 % SDS 20 % Methanol	Blockierlösung	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,2 % (v/v) Tween 20 5 % (w/v) Magermilchpulver
TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl	TBST	TBS 0,2 % Tween 20

Die Detektion der Antikörper-Proteinkomplexe erfolgte mit dem ECL System (*SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate* von PIERCE) nach Angaben des Herstellers.

6.3.5.3 Quantitative *Western Blot* Analyse

Der *Western Blot* wurde wie oben beschrieben vorbereitet, allerdings erfolgte die Detektion der Proteinbanden nicht mit einem Röntgenfilm, sondern mit dem Fluoroimagersystem der Firma BIORAD. Ferner wurden die Antikörper um den Faktor 5 weniger verdünnt, und es wurde ein ECL System mit höherer Sensitivität und Signaldauer verwendet (*SuperSignal® West Dura Chemiluminescent Substrate* von PIERCE).

6.3.6 Western „Stripping“

Zur Neudekoration mit anderen primären Antikörpern können die Antikörperkomplexe mit SDS und β -Mercaptoethanol wieder von der Membran entfernt werden. Dazu wurde der Blot 30 min bei 50°C in *Strippingpuffer* inkubiert und anschließend zweimal 10 min mit TBS gewaschen. Nach dem Blockieren erfolgte die erneute Antikörperdekoration wie unter 6.3.5.2 beschrieben.

Strippingpuffer 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7
2 % SDS
100 mM β -Mercaptoethanol

6.3.7 *In vivo* Lipidoligosaccharid-Markierung mit [3 H]Glukosamin

40 OD₆₀₀ Einheiten einer Hefekultur mit OD₆₀₀ 1-3 wurden geerntet und mit YEP Medium gewaschen. Die Markierung erfolgte mit 100 μ Ci [6- 3 H]Glukosamin (33 Ci/mmol, Amersham Biosciences) in 200 μ l YEP für 30 min bei 30°C im Wasserbadsschüttler. Mit 4 ml Chloroform/Methanol (C/M) 3:2 wurde die Markierung gestoppt. Das Zellpellet wurde 2-mal mit je 3 ml C/M 3:2 nachgewaschen. Alle Extrakte wurden vereinigt und unter N₂ bis zur Trockene eingeblasen. Es folgte eine Folchverteilung mit 3 ml C/M 3:2 und 0,6 ml H₂O. Die Chloroform/Methanol Phase wurde 3-mal mit einer *upper phase* (Chloroform/Methanol/Wasser (C/M/H) 3:48:48 gewaschen, anschließend wieder unter N₂ bis zur Trockene eingeblasen, in 350 μ l C/M 3:2 aufgenommen, durch einen Milliporefilter zentrifugiert, nochmals aufkonzentriert und mit Dünschichtchromatographie auf einer Aluminium Dünnschichtplatte (Merck Kieselgel G60) mit dem Laufmittel C/M/H 65:25:4 analysiert. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit dem *TLC Radioanalyzer* der Firma BERTHOLD.

6.3.8 *In vivo* Lipidoligosaccharid-Markierung mit [3 H]Mannose

40 OD₆₀₀ Einheiten einer Hefekultur wurden geerntet und einmal mit Vollmedium ohne Glukose (YEP) gewaschen, in 200 μ l YEP mit 100 μ Ci [2- 3 H] Mannose (15 Ci/mmol, Amersham Biosciences) aufgenommen und 15 min bei 30°C im Wasserbadsschüttler inkubiert. Der Markierungsansatz wurde mit 4 ml C:M 3:2 gestoppt und die Zellen 5 min bei 1200 x g pelletiert. Das Pellet wurde 3-mal mit je 3 ml C:M 3:2, 2-mal mit je 3 ml *upper phase* mit MgCl₂ (48 % (v/v) Methanol, 3 % (v/v) Chloroform, 4 mM MgCl₂), 2-mal mit je 3 ml *upper phase* ohne MgCl₂ und die LLO Fraktion 3-mal mit je 3 ml C/M/H 10:10:3 (v/v/v) extrahiert.

Alle CMH-Extrakte wurden unter N₂ bei 37°C bis zur Trockene eingeblasen, in 1 ml C:M:H 10:10:3 (v/v/v) wieder aufgenommen und die Radioaktivität eines Aliquots bestimmt. Der Rest des Ansatzes wurde mit 0,02 N HCl mildsauer hydrolysiert und nach einer erneuten Folchverteilung,

bei der die in der wässrigen Phase befindlichen Oligosaccharide aufkonzentriert und von dem Lipidanteil getrennt wurden, über HPLC analysiert.

Die Auftrennung der Oligosaccharide erfolgte an einer Säule der Firma Supelco (SUPELCOSIL™ LC-NH₂, 5 µm, 25 cm) mit einem linearen Gradienten der in 75 min von 80:20 (v/v) Acetonitril: H₂O bis 50:50 Acetonitril: H₂O verläuft. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem Durchflussszintillationszähler quantifiziert. Die Zuordnung der Retentionszeiten zu bestimmten Verbindungen erfolgte durch Vergleich mit definierten Referenzverbindungen.

6.3.9 Dol-PP-GlcNAc₁ Substratsynthese

Durch Solubilisierung mit DHPG kann selektiv die Aktivität der N-Acetylglukosaminphosphattransferase (GPT, Alg7p) aus den Membranen herausgelöst werden. Im *in vitro* Test beträgt die MgCl₂ Konzentration 24 mM, wodurch die GNT (Alg13p/Alg14p) schon teilweise gehemmt wird.

Solubilisierung:

Die Solubilisierung erfolgte bei einem Proteingehalt von 6,48 µg/µl und einem DHPG/Protein Verhältnis von 0,4 nmol/µg Protein.

1,873 mg Membranprotein lagen in 177 µl Membranpuffer vor. Jeweils unter vortexen wurden 108,4 µl 4 M NaCl und 7,5 µl 100 mM DHPG zugegeben. Die Solubilisierung erfolgte 20 min bei 4°C. Das Solubilisat wurde durch Zentrifugation bei 150 000 × g 40 min gewonnen.

Prämix:

Je Reaktion wurden 0,05 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc und 5,25 µg Dolicholphosphat eingesetzt. Außerdem wurden 0,3 mM Phosphatidylglycerol, 4,2 mM Dimercaptopropanol und 0,3 mM α,β-Methylen-ATP zugegeben.

Ein Prämix für 20 Reaktionen wurde wie folgt hergestellt:

52,5 µl Dolicholphosphat (2 mg/ml) und 31 µl Phosphatidylglycerol (PG; 10 mg/ml) wurden unter N₂ bis zur Trockene eingeblasen, anschließend in 144 µl 2,5 % NP40 durch Behandlung im Ultraschallbad wieder gelöst und 200 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 160 mM MgCl₂ zugegeben.

In einem Eppendorfgefäß wurde 1 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc unter N₂ eingeblasen und in der vorher hergestellten Dolicholphosphatlösung aufgenommen. Pro Reaktion wurden 17,2 µl Prämix eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Es wurde eine 5-fach Reaktion angesetzt, bei der 250 µl Solubilisat und 86 µl Prämix 45 min bei 24°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit 2 x 2 ml C/M 3:2 gestoppt und mit 470 µl 4 mM MgCl₂ nach Folch verteilt. Die untere Phase wurde 2-mal mit 1 ml *upper phase* gewaschen. Das Substrat Dol-PP-GlcNAc₁ wurde eingeblasen und konzentriert in C/M 1:1 aufgenommen. Die

Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler bestimmt und die Reinheit des Substrats über Dünnschichtchromatographie analysiert.

upper phase: C/M/H = 3:48:48

6.3.10 *In vitro* Glukosamintransferasetest (GNT Test)

Solubilisierung:

Die Solubilisierung des Membranproteins erfolgte bei 6,5 µg/µl Protein, 1,5 % NP40; 30 mM NaCl.

Für einen Gesamtansatz von 100µl wurden 65 µl Membranpräparation (10 µg Protein/µl) mit 20 µl Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 7,2; 3 mM MgCl₂ 150 mM NaCl) versetzt und unter vortexen 15 µl NP40 (10 %) zugegeben. War die Membranpräparation höher konzentriert als 10 µg/µl Protein, wurde der Proteinextrakt mit Membranpuffer_{PIPES} (25 mM PIPES pH 6,6; 3 mM MgCl₂; 1 mM DTT ; 35 % Glycerin) auf das Volumen von 65 µl aufgefüllt. Der Solubilisierungsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 40 min bei 150 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das klare Solubilisat wurde abgenommen und in den Test eingesetzt.

Dol-PP-GlcNAc₁ Prämix

645000 cpm Dol-PP-[¹⁴C]GlcNAc₁ wurde unter Stickstoff bis zur Trockene eingeblasen, anschließend in 100 µl NP40 0,25 % gelöst und durch Zugabe von 100 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM MgCl₂) der pH Wert und die Salzkonzentration eingestellt. Anschließend wurde 20 µl unmarkiertes UDP-N-Acetylglukosamin (6 mM) zugegeben.

Pro Reaktion wurden 9,3 µl Prämix in den Test eingesetzt. Dies entspricht einer Substratmenge an Dol-PP-GlcNAc₁ von 2790 cpm und einer Salzkonzentration von 7 mM MgCl₂ im Reaktionsansatz.

Test:

30 µg solubilisiertes Membranprotein/Reaktion (\approx 4,6µl Solubilisat)

9,3 µl UDP[¹⁴C] Dol-PP-GlcNAc₁ Prämix

46,1 µl Membranpuffer_{TRIS}

Σ 60 µl Reaktionsvolumen

Die Reaktionszeit variierte je nach Bedarf zwischen 3 bis 15 min bei 24°C

Aufarbeitung:

Die Reaktion wurde mit 2 x 1 ml Chloroform/Methanol 3:2 gestoppt und anschließend durch Zugabe von 340 µl 4 mM MgCl₂ in zwei Phasen getrennt.

Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde die obere Phase abgezogen und verworfen, die untere Phase 2-mal mit *upper phase* nachgewaschen. Danach wurde die untere Phase mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen und nach Aufkonzentrierung durch Einblasen unter N₂

durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Dazu wurde das eingeblasene lipidgebundene Saccharid in 25 µl C/M 1:1 aufgenommen, auf eine Aluminium-Dünnschichtplatte (Merck Kieselgel G60) aufgetragen und in einer Laufkammer mit C/M/H 65:25:4 aufgetrennt. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimager-Screens und der Quantifizierungssoftware *OptiQuant*.

Upper phase: C/M/H = 3:48:48

6.3.11 O-GlcNAc Transferasetest

6.3.11.1. Nachweis der O-GlcNAc Modifikation an Alg13p

Nach Haltiwanger et al. [107]

50 µl der cytosolischen Fraktion aus Hefezellen, die Alg13p^{ZZ} überexprimieren, wurden in einem Reaktionspuffer, der 50 mM Na-cacodylat, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM GMP enthält mit 0,1 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc inkubiert. Nach 1 h Reaktionszeit wurde Alg13p^{ZZ} mit einer IgG Sepharose Matrix aufgereinigt (6.3.12), in 2-fach Probenpuffer aufgenommen und mittels einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Nach Färbung der Proteinbanden (6.3.5.1) wurde das Gel getrocknet und die Radioaktivität mit Hilfe des *TLC-Analyzers* (BERTHOLD) bestimmt.

6.3.11.2. Übertragung eines GlcNAc Restes auf Kaseinkinase durch Alg13p

Nach Zachara et al. [108]

Die Kaseinkinase ist ein Substrat für die cytoplasmatische O-GlcNAc Transferase (OGT).

Das Immunpräzipitat von cytosolischem Alg13p^{ZZ} bzw. aus Membranen solubilisierten Alg13p^{ZZ} (6.3.12) wurden mit der Kaseinkinase und 0,1 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 12,4 mM MgCl₂; 0,4 mM DDT für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2-fach Probenpuffer gestoppt und die Kaseinkinase über SDS-PAGE analysiert. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des *TLC-Analyzers* (BERTHOLD) detektiert.

6.3.12 Immunpräzipitation von Alg13p^{ZZ}

Die Solubilisierung erfolgte wie unter 6.3.10 für den GNT Test beschrieben. Standardmäßig wurde ein Volumen von mindestens 300 µl solubilisiert. Für die Co-Immunpräzipitations-Experimente von Alg13p^{myc} mit Alg14p^{ZZ} wurde 1 ml Membranprotein solubilisiert.

50 µl IgG Sepharosematrix (Amersham) wurde 3-mal mit 200 µl (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 3 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 17,5 % Glycerin) gewaschen.

200 µl Solubilisat wurden zu ca. 50 µl IgG Sepharose Matrix gegeben und 30 min unter „taumeln“ inkubiert. Es folgten 3 Waschschrifte mit je 200 µl Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 3 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 17,5 % Glycerin; 0,1 % NP40). Das so gewonnene Immunpräzipitat wurde

entweder mit 50 µl 0,1 M Glycin pH 3 eluiert und mit Hilfe des *Western Blots* analysiert, oder direkt in einen *in vitro* GNT Test eingesetzt. Bei Versuchen, die eine Co-Elution zeigen sollten, wurde eine Säule mit 0,5 ml IgG Sepharose Matrix und 1 ml Solubilisat verwendet.

Schloss sich an die Aufreinigung ein GNT Test an, wurde der oben beschriebene Prämix (6.3.10) zu dem Präzipitat gegeben und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die im Reaktionsansatz vorhandene wässrige Phase wurde auf ca. 50 µl geschätzt. Die dolicholgebundenen Saccharide wurden von der Sepharosematrix durch Zugabe von 1 ml C/M 1:1 – so dass im Ansatz insgesamt ein Verhältnis von C/M/H 10:10:3 herrscht – getrennt. Diese Lösung wurde unter N₂ bis zur Trockene eingeblasen und wie unter 6.3.10 beschrieben mit 2 ml C/M 3:2 und 400 µl 4 mM MgCl₂ einer Folchverteilung unterzogen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 6.3.10.

6.3.13 Reinigung von in *E. coli* heterolog exprimiertem Alg13p^{His}

Die codierende DNA Sequenz von *ALG13* wurde in den Vektor pET28-His₁₀-Tev-F/A (Olaf Stemmann) mit *Fsel/Ascl* Schnittstellen kloniert. Dieser Vektor ist gegenüber dem käuflich zu erwerbenden pET28 so verändert, dass die Schnittstellen *Fsel/Ascl* in die MCS eingefügt wurden und statt sechs Aminosäuren Histidin, zehn Histidinreste N-terminal an das Protein fusioniert sind. Dies ermöglicht eine effizientere Aufreinigung des Proteins. Das Plasmid wurde in den proteasedefizienten *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert und dort die Expression von *ALG13* mit IPTG induziert. Alle Inkubationen der *E. coli* Zellen erfolgten in 2TY Medium, supplementiert mit 50 µg/l Kanamycin.

Induktion und Zellaufschluss:

Eine Übernachtkultur der Zellen wurde 1:40 in 2TY/Kan verdünnt und für weitere 3 h bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Induktion der Expression des plasmidcodierten Gens erfolgte durch Zugabe von 400 µM IPTG und einer weiteren Wachstumsphase von 4 h. Die Zellen wurden geerntet, in 1/100 des Kulturvolumens in Aufschlusspuffer aufgenommen und anschließend 2-mal mit der *French Press* aufgeschlossen. Die lösliche Proteinfraktion wurde durch 30 min Zentrifugation bei 8000 x g gewonnen.

Aufschlusspuffer *E. coli*: 20 mM Tris/HCl pH 7,4
 200 mM NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA

Reinigung von Alg13p^{His} mit Ni-NTA Sepharose

Der Überstand wurde zu der Matrix (ca. 5 Teile Überstand, 1 Teil Matrix) gegeben und für 30 min „taumelnd“ bei 4°C inkubiert. Es folgten insgesamt sechs Waschschritte mit je 3 Säulenvolumen. Bei den Waschschritten 1-3 wurde dem Waschpuffer 50 mM Imidazol zugefügt, den Waschschritten 2-6 80 mM Imidazol. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 250 mM Imidazol in 25 mM Tris/HCl pH 8.

Waschpuffer: 25 mM Tris/HCl pH8

300 mM NaCl

X mM Imidazol

Anhang: Das Tet-Promotor System (P_{TET})

Das regulatorische Element das die Regulation der Genexpression mit Hilfe von Tetrazyklin ermöglicht ist das Tetrazyklin Resistenz Element (Tn10) aus *E. coli*. Diesem System liegt das von Gossen und Bujard 1992 entwickelte Prinzip zu Grunde [109, 110]. Der Hefestamm hat ein Regulatorprotein (tTA *tetracycline-responsive transcriptional activator*) im Genom integriert. Das tTA Protein ist ein chimäres Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor aus *E. coli* und einer Aktivierungsdomäne (VP16) aus dem Herpes simplex Virus unter der Kontrolle eines CMV Promotors, das daher konstitutiv exprimiert wird. Das jeweilige zu untersuchende Gen steht unter der Kontrolle eines Promotors der das *tet responsive Element* (TRE) enthält. Dieses Element kann auch als Operator bezeichnet werden und durch eine Aneinanderreihung mehrerer TRE Sequenzen kann die Restriktivität des Promotors erhöht werden. Die käuflich zu erwerbenden Hefestämme aus der *Huges Collection* bespielsweise enthalten sieben TRE Sequenzen im Promotorbereich (tetO₇). Wächst der Stamm ohne Tetrazyklin im Medium bindet das tTA Protein an TRE und aktiviert die Expression des dahinterliegenden Gens. Ist aber Tetrazyklin im Medium vorhanden und wird in die Zelle transportiert, entsteht ein tTA-Tetrazyklin Komplex der nicht mehr an TRE bindet und so die Expression des nachgeschaltenen Gens reprimiert. Dies beschreibt das sogenannte *tet-off* System.



Daneben existiert jedoch auch die entgegengesetzte Version – das *tet-on* System. In diesem Fall wird der reverse Transaktivator rtTA verwendet, der in Anwesenheit des Tetrazyklin Derivats Doxyzyklin an die TRE Sequenz im Promotor des zu untersuchenden Gens bindet. Bei diesem *tet-on* System wird also die Genexpression in Anwesenheit von Doxyzyklin induziert.

In Säugerzellen kann die konstitutive Expression des tTA Proteins zytotoxisch wirken. Um diese toxische Wirkung zu verhindern wird eine weitere Variante des tet-Systems verwendet, bei der die Expression des tTA Proteins ebenfalls durch eine TRE Sequenz im Promotor durch Tetrazyklin induziert wird (Schockett et al 1995). Der Große Nachteil dieses Systems liegt in der Verwendung eines Antibiotikums das auf lange Sicht nachteilige Auswirkungen auf die entsprechenden Zellen *in vivo* haben kann.

Verwendete Datenbanken

SGD Hefedatenbank
<http://www.yeastgenome.org/>

NCBI
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

CAZY
<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

Interaktionsdatenbank

Yeast resource center
<http://depts.washington.edu/~yeastrc/>

BioGRID
<http://www.thebiogrid.org/index.php>

Topologievorhersageprogramme:

TMHMM
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

Tmpred
http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Toppred
<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>

Vorhersabeprogramme für Proteinmodifikationen
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

SOSUI
http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html

EXPASY
<http://www.expasy.org/tools/#secondary>

Sanger Institute
<http://www.sanger.ac.uk>

Proteinalignments wurden mit ClustalW mit Hilfe des Programms BioEdit erstellt

Literaturverzeichnis

1. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
2. Shendure, J., et al., *Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1728-32.
3. Hickman, S., L.J. Shapiro, and E.F. Neufeld, *A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **57**(1): p. 55-61.
4. von Figura, K. and A. Hasilik, *Lysosomal enzymes and their receptors*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 167-93.
5. Valentin, E., et al., *Cell wall mannoproteins during the population growth phases in Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol, 1987. **148**(2): p. 88-94.
6. Varki, A. and H.H. Freeze, *The major glycosylation pathways of mammalian membranes. A summary*. Subcell Biochem, 1994. **22**: p. 71-100.
7. Hanisch, F.G., *O-glycosylation of the mucin type*. Biol Chem, 2001. **382**(2): p. 143-9.
8. McGuire, E.J. and S. Roseman, *Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin*. J Biol Chem, 1967. **242**(16): p. 3745-7.
9. Wang, Y., et al., *Purification and characterization of a UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase specific for glycosylation of threonine residues*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12709-16.
10. Haselbeck, A. and W. Tanner, *O-glycosylation in Saccharomyces cerevisiae is initiated at the endoplasmic reticulum*. FEBS Lett, 1983. **158**(2): p. 335-8.
11. Strahl-Bolsinger, S., M. Gentzsch, and W. Tanner, *Protein O-mannosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 297-307.
12. Willer, T., et al., *O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 621-30.
13. Chai, W., et al., *High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis*. Eur J Biochem, 1999. **263**(3): p. 879-88.
14. Gentzsch, M. and W. Tanner, *The PMT gene family: protein O-glycosylation in Saccharomyces cerevisiae is vital*. Embo J, 1996. **15**(21): p. 5752-9.
15. Barresi, R. and K.P. Campbell, *Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 2): p. 199-207.
16. Beltran-Valero de Bernabe, D., et al., *Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(5): p. 1033-43.

17. Yoshida, A., et al., *Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 717-24.
18. Comer, F.I. and G.W. Hart, *O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29179-82.
19. Zachara, N.E., W.D. Cheung, and G.W. Hart, *Nucleocytoplasmic glycosylation, O-GlcNAc: identification and site mapping*. Methods Mol Biol, 2004. **284**: p. 175-94.
20. Jinek, M., et al., *The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(10): p. 1001-7.
21. Arnold, C.S., et al., *The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28741-4.
22. Alonso, A.C., I. Grundke-Iqbali, and K. Iqbal, *Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 783-7.
23. Previato, J.O., et al., *Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in Trypanosoma cruzi. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14982-8.
24. Lechner, J. and F. Wieland, *Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 173-94.
25. Kelly, J., et al., *Biosynthesis of the N-linked glycan in Campylobacter jejuni and addition onto protein through block transfer*. J Bacteriol, 2006. **188**(7): p. 2427-34.
26. Larsen, J.C., C. Szymanski, and P. Guerry, *N-linked protein glycosylation is required for full competence in Campylobacter jejuni 81-176*. J Bacteriol, 2004. **186**(19): p. 6508-14.
27. Wieland, F., G. Paul, and M. Sumper, *Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins*. J Biol Chem, 1985. **260**(28): p. 15180-5.
28. Huffaker, T.C. and P.W. Robbins, *Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation*. J Biol Chem, 1982. **257**(6): p. 3203-10.
29. Huffaker, T.C. and P.W. Robbins, *Yeast mutants deficient in protein glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(24): p. 7466-70.
30. Jaeken, J. and G. Matthijs, *Congenital disorders of glycosylation*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 129-51.
31. Paulson, J.C., *Glycoproteins: what are the sugar chains for?* Trends Biochem Sci, 1989. **14**(7): p. 272-6.
32. Helenius, A., *How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(3): p. 253-65.
33. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 97-130.

34. Wormald, M.R. and R.A. Dwek, *Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability*. Structure, 1999. **7**(7): p. R155-60.
35. Beintema, J.J., *Do asparagine-linked carbohydrate chains in glycoproteins have a preference for beta-bends?* Biosci Rep, 1986. **6**(8): p. 709-14.
36. Kern, G., et al., *Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from *Saccharomyces cerevisiae**. Protein Sci, 1993. **2**(11): p. 1862-8.
37. Jaenicke, R., *Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies*. Biochemistry, 1991. **30**(13): p. 3147-61.
38. Plihal, O., et al., *N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 5): p. 764-5.
39. Burda, P. and M. Aebi, *The dolichol pathway of N-linked glycosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 239-57.
40. Lehle L, Strahl S, and T. W., *Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(41): p. 6802-18.
41. Sato, M., et al., *The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 471-83.
42. Heller, L., P. Orlean, and W.L. Adair, Jr., *Saccharomyces cerevisiae sec59 cells are deficient in dolichol kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7013-6.
43. Kukuruzinska, M.A. and K. Lennon, *Diminished activity of the first N-glycosylation enzyme, dolichol-P-dependent N-acetylglucosamine-1-P transferase (GPT), gives rise to mutant phenotypes in yeast*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1247**(1): p. 51-9.
44. Lehle, L. and W. Tanner, *The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives*. FEBS Lett, 1976. **72**(1): p. 167-70.
45. Sharma, C.B., L. Lehle, and W. Tanner, *N-Glycosylation of yeast proteins. Characterization of the solubilized oligosaccharyl transferase*. Eur J Biochem, 1981. **116**(1): p. 101-8.
46. Albright, C.F. and R.W. Robbins, *The sequence and transcript heterogeneity of the yeast gene ALC1, an essential mannosyltransferase involved in N-glycosylation*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 7042-9.
47. O'Reilly, M.K., G. Zhang, and B. Imperiali, *In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis*. Biochemistry, 2006. **45**(31): p. 9593-603.
48. Helenius, J., et al., *Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 447-50.

49. Sharma, C.B., R. Knauer, and L. Lehle, *Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in yeast: the ALG3 gene encodes the Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase*. Biol Chem, 2001. **382**(2): p. 321-8.
50. Verostek, M.F., P.H. Atkinson, and R.B. Trimble, *Glycoprotein biosynthesis in the alg3 Saccharomyces cerevisiae mutant. II. Structure of novel Man6-10GlcNAc2 processing intermediates on secreted invertase*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 12104-15.
51. Frank, C.G. and M. Aebi, *ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis*. Glycobiology, 2005. **15**(11): p. 1156-63.
52. Cipollo, J.F. and R.B. Trimble, *The Saccharomyces cerevisiae alg12delta mutant reveals a role for the middle-arm alpha1,2Man- and upper-arm alpha1,2Manalpha1,6Man- residues of Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol in regulating glycoprotein glycan processing in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Glycobiology, 2002. **12**(11): p. 749-62.
53. Reiss, G., et al., *Isolation of the ALG6 locus of Saccharomyces cerevisiae required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway*. Glycobiology, 1996. **6**(5): p. 493-8.
54. Stagljar, I., S. te Heesen, and M. Aebi, *New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the ALG8 locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5977-81.
55. Burda, P. and M. Aebi, *The ALG10 locus of Saccharomyces cerevisiae encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation*. Glycobiology, 1998. **8**(5): p. 455-62.
56. Munoz, M.D., et al., *Glycosylation of yeast exoglucanase sequons in alg mutants deficient in the glucosylation steps of the lipid-linked oligosaccharide. Presence of glucotriose unit in Dol-PP-GlcNAc2Man9Glc3 influences both glycosylation efficiency and selection of N-linked sites*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1201**(3): p. 361-6.
57. Knauer, R. and L. Lehle, *The oligosaccharyltransferase complex from yeast*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 259-73.
58. Knauer, R. and L. Lehle, *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, 1999. **274**(24): p. 17249-56.
59. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering*. Protein Eng, 1990. **3**(5): p. 433-42.
60. Nilsson, I. and G. von Heijne, *Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17338-43.
61. Trombetta, E.S. and A. Helenius, *Lectins as chaperones in glycoprotein folding*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(5): p. 587-92.
62. Hughes, E.A. and P. Cresswell, *The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex*. Curr Biol, 1998. **8**(12): p. 709-12.

63. Morrice, N.A. and S.J. Powis, *A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules*. Curr Biol, 1998. **8**(12): p. 713-6.
64. Hosokawa, N., et al., *A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation*. EMBO Rep, 2001. **2**(5): p. 415-22.
65. Moremen, K.W., R.B. Trimble, and A. Herscovics, *Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway*. Glycobiology, 1994. **4**(2): p. 113-25.
66. Cabral, C.M., et al., *Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 25015-22.
67. Liu, Y., et al., *Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5861-7.
68. Liu, Y., et al., *Intracellular disposal of incompletely folded human alpha1-antitrypsin involves release from calnexin and post-translational trimming of asparagine-linked oligosaccharides*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7946-51.
69. Jakob, C.A., et al., *Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast*. EMBO Rep, 2001. **2**(5): p. 423-30.
70. Nakatsukasa, K., et al., *Mnl1p, an alpha -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8635-8.
71. Szymanski, C.M., et al., *Campylobacter--a tale of two protein glycosylation systems*. Trends Microbiol, 2003. **11**(5): p. 233-8.
72. Szymanski, C.M. and B.W. Wren, *Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 225-37.
73. Young, N.M., et al., *Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni**. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42530-9.
74. Nita-Lazar, M., et al., *The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation*. Glycobiology, 2005. **15**(4): p. 361-7.
75. Kowarik, M., et al., *Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence*. Embo J, 2006. **25**(9): p. 1957-66.
76. Beyer, T.A., et al., *Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1981. **52**: p. 23-175.
77. Paulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
78. Campbell, J.A., et al., *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 3): p. 929-39.

79. Coutinho, P.M., et al., *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. J Mol Biol, 2003. **328**(2): p. 307-17.
80. Unligil, U.M. and J.M. Rini, *Glycosyltransferase structure and mechanism*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 510-7.
81. Henrissat, B. and P.M. Coutinho, *Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles*. Methods Enzymol, 2001. **330**: p. 183-201.
82. Breton, C. and A. Imbert, *Structure/function studies of glycosyltransferases*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): p. 563-71.
83. Rosen, M.L., et al., *Recognition of fold and sugar linkage for glycosyltransferases by multivariate sequence analysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38683-92.
84. Rossmann, M.G., D. Moras, and K.W. Olsen, *Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein*. Nature, 1974. **250**(463): p. 194-9.
85. Breton, C., J. Mucha, and C. Jeanneau, *Structural and functional features of glycosyltransferases*. Biochimie, 2001. **83**(8): p. 713-8.
86. Chen, L., et al., *Intrinsic lipid preferences and kinetic mechanism of Escherichia coli MurG*. Biochemistry, 2002. **41**(21): p. 6824-33.
87. Gibson, R.P., et al., *Characterization of Escherichia coli OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002. **58**(Pt 2): p. 349-51.
88. Sharma, C.B., L. Lehle, and W. Tanner, *Solubilization and characterization of the initial enzymes of the dolichol pathway from yeast*. Eur J Biochem, 1982. **126**(2): p. 319-25.
89. Ha, S., et al., *The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis*. Protein Sci, 2000. **9**(6): p. 1045-52.
90. Hu, Y., et al., *Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 845-9.
91. Gao, X.D., et al., *Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36254-62.
92. Grant, S.G., et al., *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4645-9.
93. Vijayraghavan, U., M. Company, and J. Abelson, *Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1989. **3**(8): p. 1206-16.
94. Thomas, B.J. and R. Rothstein, *The genetic control of direct-repeat recombination in Saccharomyces: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene*. Genetics, 1989. **123**(4): p. 725-38.

95. Gietz, R.D. and A. Sugino, *New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites*. Gene, 1988. **74**(2): p. 527-34.
96. Sauer, N. and J. Stolz, *SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein*. Plant J, 1994. **6**(1): p. 67-77.
97. Guldener, U., et al., *A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(13): p. 2519-24.
98. Vernet, T., D. Dignard, and D.Y. Thomas, *A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region*. Gene, 1987. **52**: p. 225-233.
99. Jungmann, J. and S. Munro, *Multi-protein complexes in the cis Golgi of Saccharomyces cerevisiae with alpha-1,6-mannosyltransferase activity*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 423-34.
100. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
101. Holmes, D.S. and M. Quigley, *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*. Anal Biochem, 1981. **114**(1): p. 193-7.
102. Gietz, D., et al., *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(6): p. 1425.
103. Hoffman, C.S. and F. Winston, *A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli*. Gene, 1987. **57**(2-3): p. 267-72.
104. Robzyk, K. and Y. Kassir, *A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(14): p. 3790.
105. Rose, M. and F. Winston, *Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the S. cerevisiae URA3 gene*. Mol Gen Genet, 1984. **193**(3): p. 557-60.
106. Sengstag, C., et al., *Genetic and biochemical evaluation of eucaryotic membrane protein topology: multiple transmembrane domains of Saccharomyces cerevisiae 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(2): p. 672-80.
107. Haltiwanger, R.S., G.D. Holt, and G.W. Hart, *Enzymatic Addition of O-GlcNAc to Nuclear and Cytoplasmic Proteins* J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2563-68.
108. Zachara, N.E., et al., *Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30133-42.
109. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
110. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.

111. Sengstag, C., et al., Genetic and biochemical evaluation of eucaryotic membrane protein topology: multiple transmembrane domains of *Saccharomyces cerevisiae* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 672-80.
112. Kim, H., et al., Topology Models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* Membrane Proteins based on C-terminal Reporter Fusions and Predictions. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10208-13
113. Carey, M., et al., *An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer*. *J Mol Biol*, 1989. **209**(3): p. 423-32.
114. Blum, H., Beier, H., and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis*, 1987 **8**: p. 93-99.
115. Pirner, H. M. and J. Stolz, *Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein-ligase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(18): p. 12381-89

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Ludwig Lehle für die Bereitstellung des interessanten Themas. Während der gesamten Zeit stand er neuen Ideen immer offen gegenüber. Er nahm sich auch in stressigen Momenten Zeit und war mit fachlichem Rat stets eine große Hilfe. Außerdem hat es mich sehr gefreut, dass ich die Möglichkeit hatte am 16th joint meeting in Hannover teilzunehmen und dort einen Vortrag halten zu dürfen.

Prof. Dr. Claude A Jakob (ETH, Zürich) danke ich für die ersten Hinweise Alg13 betreffend, was die Bearbeitung dieses Themas sehr beschleunigt hat.

Prof. Dr. Francoise Routier (MHH, Hannover) gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des *Leishmania major ALC14-ALC13* Gens

Bezüglich der BIO-Konstrukte möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Stolz für das Epitop und die umfassende Beratung hinsichtlich der Anzucht der Hefen und der Detektion biotinylierter Proteine bedanken. Außerdem herzlichen Dank für die vielen Plasmide, das Interesse und die Diskussionen vor allem zu Beginn meiner Arbeit. Auch der ganzen Arbeitsgruppe Stolz, vor allem Christian Vogl, Petra Reihl, Stefan Ringelstetter und Heike Pirner möchte ich für die konstruktiven Diskussionen und das sehr angenehme Arbeitsklima danken. Ganz bessonders möchte ich mich auch bei Guido Großmann bedanken, der mir bei den Aufnahmen am konfokalen Mikroskop sehr behilflich war.

Meinen Mitstreitern in der Arbeitsgruppe Lehle, Peter Hauptmann und Katrin Hese, danke ich für die Unterstützung, fertig präparierte Vektoren, Medien, Kolben und was man sonst im Alltag noch so braucht. Dr. Markus Schwarz, hat mir sämtliche Enzymtests beigebracht, war immer zu Diskussionen aufgelegt und hatte stets ein offenes Ohr für alle Widrigkeiten des Lebens. Vielen Dank dafür. Meinen Praktikanten, vor allem Benno Schierling, Franz Meitinger, Michael Kämpf und Eva Heining, danke ich für ihr Engagement im Labor, den Diplomanden Andrea Müller und Laura Klingseisen im „kleinen Labor“ für das unglaublich gute Arbeitsklima. Laura sei auch für den P_{GAL}ALG7 Stamm herzlichst gedankt. Angelika Rechenmacher möchte ich für die LLO-Markierungen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützten – und bei Michael, der für alles immer irgendeinen Vorschlag hat.

Eidesstattliche Erklärung

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

Regensburg, den 17 Juli 2007