

Studien zur Aufklärung von
Struktur-Funktionsbeziehungen der
eukaryontischen Polysialyltransferasen

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
genehmigte Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Michaela Windfuhr

geboren am 27. August 1972 in Dortmund

2000

Referentin: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 26. Juni 2000

INHALTSVERZEICHNIS:

	INHALTSVERZEICHNIS	I
	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	VI
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
	ZUSAMMENFASSUNG	X
	ABSTRACT	XI
I	EINLEITUNG	1
I 1	Sialinsäuren	1
I 1.1	Struktur	1
I 1.2	Vorkommen und Funktion	1
I 1.2.1	Prokaryonten, Protozoen und Viren	2
I 1.2.2	Eukaryonten	2
I 1.3	Biosynthese und Aktivierung	4
I 1.3.1	Prokaryonten	4
I 1.3.2	Eukaryonten	5
I 1.4	Sialyltransferasen	6
I 1.4.1	Prokaryonten und Viren	6
I 1.4.2	Eukaryonten	6
I 1.4.2.1	Strukturmerkmale	7
I 1.4.2.2	Intrazelluläre Lokalisation	8
I 2	Polysialinsäuren	9
I 2.1	Struktur	9
I 2.2	Vorkommen und Funktion	10
I 2.2.1	Prokaryonten	10
I 2.2.2	Eukaryonten	11
I 2.2.2.1	Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)	11
I 2.3	Polysialyltransferasen	13
I 2.3.1	Prokaryonten	14
I 2.3.2	Eukaryonten	14
I 2.3.2.1	Unterschiede zwischen PST und STX	15
I 3	Zielsetzung der Arbeit	17
II	MATERIAL UND METHODEN	18
II 1	Material	18
II 1.1	Zelllinien	18
II 1.2	Zellkulturmedien und –zusätze	18
II 1.3	Bakterienstamm	18
II 1.4	Bakterienmedien	19
II 1.5	Oligonukleotide und Primer	19
II 1.6	Vektoren und Plasmide	21
II 1.7	Enzyme	23

II 1.8	Antikörper	23
II 1.9	Standardpuffer und -lösungen	24
II 1.10	Molekulargewichtsmarker	24
II 1.11	Kits	25
II 1.12	Geräte	25
II 1.13	Chemikalien	26
II 1.14	Sonstige Materialien	27
II 2	Methoden	28
II 2.1	Molekularbiologische Methoden	28
II 2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
II 2.1.1.1	Schnelltest zur Überprüfung der Plasmidgröße	28
II 2.1.1.2	Analytische Plasmidpräparation	28
II 2.1.1.3	Mini-Plasmidpräparation	28
II 2.1.1.4	Midi-Plasmidpräparation	29
II 2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
II 2.1.3	Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	29
II 2.1.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	29
II 2.1.5	Phenol/Chloroform-Extraktion	30
II 2.1.6	Präzipitation von DNA	30
II 2.1.7	Restriktionsspaltung von DNA	30
II 2.1.8	Dephosphorylierung	30
II 2.1.9	Ligation	30
II 2.1.10	Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotid-Adapttern	31
II 2.1.11	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i>	31
II 2.1.12	Transformation	31
II 2.1.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
II 2.1.14	Mutagenese mittels PCR	32
II 2.1.15	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	32
II 2.1.15.1	Radioaktive Sequenzierung	32
II 2.1.15.2	Automatische Sequenzierung	33
II 2.1.16	Isolierung von gesamt-RNA	33
II 2.1.17	Isolierung von mRNA (poly(A ⁺)-RNA)	33
II 2.1.18	RT-PCR	34
II 2.1.18.1	cDNA-Synthese	34
II 2.1.18.2	PCR	34
II 2.1.19	Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen	35
II 2.1.20	Northern Blot	36
II 2.1.21	Methylenblaufärbung	36
II 2.1.22	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	36
II 2.1.23	Hybridisierung	37
II 2.1.24	Chemilumineszenzreaktion mit CSPD	37
II 2.2	Zellbiologische Methoden	37
II 2.2.1	Kultivierung von Zellen	37
II 2.2.2	Auftauen von Zellen	37
II 2.2.3	Einfrieren von Zellen	38
II 2.2.4	Kultivierung von CHO-Zellen zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen	38
II 2.2.5	Kultivierung von Hybridoma-Zellen zur Antikörpergewinnung	38
II 2.2.6	Solubilisierung von Zellen	38

II 2.2.7	Fusion von Zellen	38
II 2.2.8	Transiente Transfektion von Zellen	39
II 2.2.8.1	Transfektion mit LipofectAMINE [169]	39
II 2.2.8.2	Transfektion mit SuperFect	39
II 2.2.8.3	Transfektion mit Effectene	39
II 2.2.9	Immunzytochemie	39
II 2.2.10	Zytochemischer Nachweis von β -Galaktosidase	40
II 2.2.11	Immunfluoreszenz	40
II 2.3	Proteinbiochemische Methoden	40
II 2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
II 2.3.2	Silberfärbung	41
II 2.3.3	Roti-Blue-Färbung	41
II 2.3.4	Western Blot	41
II 2.3.5	Immunfärbung von Western Blots	41
II 2.3.6	Kopplung von Antikörpern an ProteinG	41
II 2.3.7	Immunpräzipitation	42
II 2.3.8	Endo NE-Verdau	42
II 2.3.9	Exoneuraminidase-Verdau	42
II 2.3.10	PNGaseF-Verdau	42
II 2.3.11	Alkylierung mit ABDF [171]	42
II 2.3.12	Ankonzentrierung von Proteinen (Filtron)	43
II 2.3.13	Proteinaufreinigung	43
II 2.3.13.1	Antikörper	43
II 2.3.13.2	MycHis-Fusionsproteine	43
II 2.3.14	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
II 2.3.15	Test auf Polysialylierungsaktivität <i>in vitro</i>	44
II 2.3.15.1	Autopolysialylierung	44
II 2.3.15.2	NCAM-Polysialylierung	45
III	ERGEBNISSE	46
III 1	Molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10	46
III 1.1	RNA-Präparation und Northern Blot-Analyse	46
III 1.2	Fusion von 2A10-Zellen	49
III 1.3	RT-PCR	50
III 1.4	Sequenzierung von cDNAs	51
III 2	Charakterisierung der von 2A10-Mutationen abgeleiteten PST- und STX-Mutanten	56
III 2.1	Zielgerichtete Mutagenese zum Einfügen von 2A10-Mutationen in die Wildtypsequenzen von PST und STX	56
III 2.2	Expression in 2A10-Zellen	59
III 2.3	Test auf <i>in vitro</i> -Aktivität	61
III 2.4	Intrazelluläre Lokalisation	67
III 2.5	Weiterführende Charakterisierung der Mutanten PST/R277G und PST/M333V	71
III 2.5.1	Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in 2A10-Zellen	71
III 2.5.2	Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in COS-Zellen	72
III 2.5.3	Autopolysialylierung von TM-PST/R277G <i>in vivo</i>	73
III 2.5.4	Ko-Expression von PST/R277G und PST/M333V in 2A10-Zellen	73
III 2.5.5	Ko-Expression von PST/M333V und Wildtyp-PST in 2A10-Zellen	75

III 2.5.6	Vergleich der <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Aktivität von PST/M333V und PST/M333L	75
III 2.6	Charakterisierung der Mutanten PST/M284I, STX/M299I, PST/Q359R	76
III 3	Studien zur Eingrenzung der katalytischen Domäne der PST	78
III 3.1	Herstellung und Charakterisierung von N- und C-terminal verkürzten PST-Varianten	80
III 4	Studien zur Bedeutung der Cysteine in der PST	80
III 4.1	Herstellung und Charakterisierung der Cysteinmutanten	81
III 4.2	Herstellung und Charakterisierung von PST/C356S	82
III 5	Rekombinante Herstellung und Reinigung von PST- und STX-MycHis-Fusionsproteinen	83
III 5.1	Aufreinigung der Fusionsproteine nach Ankonzentrierung im Filtron	83
III 5.1.1	STX-MycHis	83
III 5.1.2	PST-MycHis	85
III 5.2	Aufreinigung von PST-MycHis ohne vorherige Ankonzentrierung	87
III 6	Charakterisierung des PST-MycHis-Fusionsproteins	88
III 6.1	Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF	88
III 6.2	Alkylierung mit ABDF	90
III 6.3	Proteolytische Spaltung mit Trypsin und Chymotrypsin	92
IV	DISKUSSION	93
IV 1	Molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10	94
IV 1.1	Expression von PST-mRNAs	94
IV 1.2	Defekte in PST-cDNAs	95
IV 2	Einfluss ausgewählter Aminosäuren auf die Struktur und Funktion von PST und STX	95
IV 2.1	Aktivitätsprofile und Vergleich der rekombinant hergestellten PST und STX	97
IV 2.2	Methionin ¹ - Lysin ⁵⁸ (PST) / Methionin ¹ - Asparaginsäure ⁶⁹ (STX)	98
IV 2.3	Cystein ¹⁴² (PST)	99
IV 2.4	Glycin ¹⁴⁶ (PST) / Glycin ¹⁶¹ (STX)	99
IV 2.5	Cystein ¹⁵⁶ (PST) / Cystein ¹⁶⁹ (PST)	100
IV 2.6	Threonin ¹⁸⁹ (PST) / Threonin ²⁰⁴ (STX)	100
IV 2.7	Valin ²³⁰ (PST)	101
IV 2.8	Arginin ²⁷⁷ (PST) / Arginin ²⁹² (STX)	101
IV 2.9	Glycin ²⁸¹ (PST) / Glycin ²⁹⁶ (STX)	103
IV 2.10	Methionin ²⁸⁴ (PST) / Methionin ²⁹⁹ (STX)	104
IV 2.11	Cystein ²⁹² (PST)	104
IV 2.12	Methionin ³³³ (PST) / Methionin ³⁴⁸ (STX)	105
IV 2.13	Glutaminsäure ³³⁶ (PST) / Glutaminsäure ³⁵¹ (STX)	106
IV 2.14	Cystein ³⁵⁶ (PST) / Cystein ³⁷¹ (STX)	107
IV 2.15	Methionin ³⁵⁷ - Glutamin ³⁵⁹ (PST)	108

IV 3	Zusammenfassung der Struktur-Funktionsanalyse	109
IV 3.1	Überlegungen zum Reaktionsmechanismus	110
IV 3.2	Überlegungen zur Disulfidbrückenstruktur	113
IV 4	Ausblick	114
V	LITERATURVERZEICHNIS	115
VI	ANHANG	125
VI 1	cDNA-Sequenz der Hamster-PST (ST8SiaIV)	125
VI 2	Aminosäuren, die in anderen Sialyltransferasen anstelle der in 2A10 mutierten Positionen vorkommen	126
VI 3	Tabellarische Zusammenstellung der bis jetzt klonierten eukaryontischen Sialyltransferasen	127
VI 4	Lebenslauf	130
VI 5	Publikationen	131

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS:

Abb. 1:	Struktur von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Keto-deoxynonulosonsäure (KDN).	1
Abb. 2:	Biosynthese von CMP-Neu5Ac in Pro- und Eukaryonten.	5
Abb. 3:	Typ II-Membrantopologie der Sialyltransferasen.	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung von NCAM-140 in polysialyliertem Zustand.	12
Abb. 5:	Hypothetische Struktur des PSA-tragenden Kohlenhydratgrundgerüsts.	12
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Zielsequenz von RT-PCR-Primern.	35
Abb. 7:	Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> -Tests auf Auto- und NCAM-Polysialylierungsaktivität.	45
Abb. 8:	Vergleich der mRNA-Menge und -qualität im Formaldehyd-Agarosegel und im Northern Blot.	48
Abb. 9:	Northern Blot-Analyse zum Nachweis von PST-mRNA in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10.	49
Abb. 10:	RT-PCR der Klone 1C5, 1G4, 2B12 und 2D5 im Vergleich zum Wildtyp.	50
Abb. 11:	RT-PCR des Klons 8F8 im Vergleich zum Wildtyp.	51
Abb. 12:	Schematische Darstellung der Defekte in PST-cDNAs des Klons 8F8.	53
Abb. 13:	Fließdiagramm zur Übersicht über den Verlauf der Analyse der Komplementationsgruppe 2A10.	53
Abb. 14:	Schematische Darstellung der durch 2A10-Mutationen bedingten Aminosäureaustausche im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive.	54
Abb. 15:	Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Sialyltransferasen im Bereich der Sialylmotive mit Hinblick auf die in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 mutierten Positionen.	55
Abb. 16:	Schematische Darstellung der membranständigen und löslichen Fusionsproteine von PST und STX.	57
Abb. 17:	Expression der TM-PST-Mutanten in 2A10-Zellen.	60
Abb. 18:	Expression der TM-STX-Mutanten in 2A10-Zellen.	60
Abb. 19:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von PST/T189I, PST/R277G und PST/V230A/R277G.	62
Abb. 20:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von PST/M333V und PST/C356F.	63
Abb. 21:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von PST/G146E, PST/G281S und PST/E336K.	64
Abb. 22:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von STX/T204I, STX/R292G und STX/M348V.	65
Abb. 23:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von STX/G161E und STX/G296S sowie von STX/E351K und STX/C371F.	66
Abb. 24:	Intrazelluläre Lokalisation der PST-Mutanten.	68
Abb. 25:	Intrazelluläre Lokalisation der Mutante PST/C356F.	69
Abb. 26:	Intrazelluläre Lokalisation der Mutanten STX/R292G und STX/M348V.	71
Abb. 27:	Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in COS-Zellen.	72
Abb. 28:	<i>In vivo</i> -Autopolysialylierung der Mutanten TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in 2A10-Zellen.	73
Abb. 29:	Ko-Expression der Mutanten PST/R277G und PST/M333V in 2A10-Zellen.	74
Abb. 30:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von PST/M333V und PST/M333L.	76
Abb. 31:	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest von PST/M284I und STX/M299I.	78
Abb. 32:	Schematische Darstellung der N-terminalen PST-Verkürzungen.	79
Abb. 33:	Darstellung der C-terminalen Verkürzungen der PST.	79
Abb. 34:	Schematische Darstellung der Cysteine im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive.	81
Abb. 35:	Expression der Cysteinmutanten der PST in 2A10-Zellen.	82

Abb. 36:	Überprüfung der Durchläufe und Waschpuffer der Aufreinigung des STX-MycHis-Fusionsproteins (Immunpräzipitationen).	84
Abb. 37:	Elutionsprofil des STX-MycHis-Fusionsproteins nach der dritten Anlagerung an die Säule.	85
Abb. 38:	Überprüfung der Durchläufe und Waschpuffer der Aufreinigung des PST-MycHis-Fusionsproteins (Immunpräzipitationen).	86
Abb. 39:	Elution des PST-MycHis-Fusionsproteins nach der ersten Anlagerung an die Säule.	86
Abb. 40:	Aufreinigung von PST-MycHis ohne vorherige Ankonzentrierung.	87
Abb. 41:	Analyse der PNGaseF-Verdau des PST-MycHis-Fusionsproteins im Western Blot.	89
Abb. 42:	Konzentrationsbestimmung des deglykosylierten PST-MycHis-Fusionsproteins.	90
Abb. 43:	Alkylierung von BSA und PST-MycHis mit ABDF.	91
Abb. 44:	Darstellung aller im Abschnitt IV 2 aufgeführten Mutationen und ihrer Lage im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive L, S und VS.	96
Tab. 1:	Einordnung der Sialyltransferasen in Untergruppen.	7
Tab. 2:	Primerkombinationen, die zur reversen Transkription und anschließenden Amplifikation der PST-cDNAs verwendet wurden.	35
Tab. 3:	Isolation von mRNA aus Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 und aus Kontrollzellen.	47
Tab. 4:	Tabellarische Darstellung der in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 aufgetretenen Punktmutationen in den PST-cDNAs und den daraus resultierenden Aminosäureaustauschen.	52
Tab. 5:	2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch Umklonierung generiert wurden.	58
Tab. 6:	2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch Fusions-PCR generiert wurden.	58
Tab. 7:	2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch PCR generiert wurden.	59
Tab. 8:	Tabellarische Darstellung der <i>in vitro</i> -Aktivitäten aller PST- und STX-Varianten mit 2A10-Mutationen.	67
Tab. 9:	Zur Mutagenese der Cysteinmutanten der PST verwendete Primer und Restriktionsenzyme.	81
Tab. 10:	Tabellarische Zusammenfassung der Struktur-Funktionsanalyse der Polysialyltransferasen.	109
Tab. 11:	Auswahl einiger Sialyltransferasen mit den Zugangsnummern in der Gen-Datenbank unter Berücksichtigung der sich in diesen Enzymen anstelle der in 2A10-Klonen mutierten Positionen befindenden Aminosäuren.	127
Tab. 12:	Tabellarische Zusammenstellung der bis jetzt klonierten Sialyltransferasen aus allen landlebenden Vertebraten mit Angabe der Zugangsnummer in der Gen-Datenbank und der entsprechenden Literaturstelle.	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

Abb.	Abbildung
ABDF	7-Fluorobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonamid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytosintri-phosphat
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTAF	Dichlorotriazinylamino fluoreszein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo NE	Endoneuraminidase NE
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FCS	Fötale Kälberserum
GlcN	Glukosamin
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	'High Performance Liquid Chromatography'
HT	Hypoxanthin / Thymidin
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KDN	Ketodeoxynonosonsäure
LB	Luria / Bertani (Medium)
ManNAc	N-Acetylmannosamin
mAk	monoklonaler Antikörper
ME	Mercaptoethanol
min	Minute
mRNA	'messenger' (Boten)-RNA

NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
NP 40	Nonidet 40
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung ('phosphate buffered saline')
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PEG	Polyethylenglykol 8000
PSA	Polysialinsäure
PST	Polysialyltransferase (ST8SiaIV)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST(s)	Sialyltransferase(n)
STX	Sialyltransferase X (ST8SiaII)
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris-(2-cyanoethyl)phosphine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TTP	Thymintriphosphat
upm	Umdrehungen pro Minute
UDP	Thyminmonophosphat
UTP	Thymintriphosphat
UTR	nicht-translatierte Region
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktosid

ZUSAMMENFASSUNG:

Polysialinsäure (PSA) ist ein Homopolymer aus α 2,8-verknüpften Sialinsäuren, das sowohl bei den Pro- als auch bei den Eukaryonten weit verbreitet ist. Bei den Vertebraten kommt PSA nahezu ausschließlich als posttranslationale Modifikation des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) vor. Durch die dynamisch regulierte Expression von polysialyliertem NCAM werden Zell-Zell-Interaktionen gewebs- und entwicklungsspezifisch moduliert. PSA spielt daher hauptsächlich während der Embryonalentwicklung bei Prozessen wie dem Neuritenwachstum und der Innervation von Muskeln eine entscheidende Rolle. Im adulten Organismus kommt PSA in Regionen mit anhaltender neuronaler Plastizität vor. Zudem wird PSA von einigen hochmalignen Tumoren reexprimiert. Die PSA-Synthese wird von zwei Polysialyltransferasen, PST (ST8SiaIV) und STX (ST8SiaII) katalysiert. Beide Enzyme sind neben ihrer Fähigkeit, NCAM zu polysialylieren, auch in der Lage, in einer autokatalytischen Reaktion sich selbst zu polysialylieren.

Mit dem Ziel, katalyse- oder strukturelevante Aminosäuren in den Polysialyltransferasen zu identifizieren, wurde die Komplementationsgruppe 2A10 auf molekularer Ebene analysiert. Die insgesamt 31 Klone dieser Gruppe haben die Fähigkeit zur PSA-Synthese aufgrund eines Defektes im PST-Gen verloren. Durch RT-PCR konnte von 10 Klonen die PST-cDNA-Sequenz ermittelt werden. Ein Klon weist die Deletion eines gesamten Exons auf. Für die restlichen Klone wurden Punktmutationen nachgewiesen, die abgesehen von einer Stop-Mutation alle zu Aminosäureaustauschen führen. Betroffen sind dabei fast ausschließlich Positionen in den Sialylmotiven, die zudem entweder in der Gruppe der α 2,8-Sialyltransferasen oder sogar in allen Sialyltransferasen (z.B. Glycin²⁸¹, Glutaminsäure³³⁶) hochkonserviert sind. 2A10-Mutationen wurden daraufhin in die Wildtypsequenzen von PST und STX eingefügt. Die meisten Mutanten zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine katalytische Aktivität. Zwei Mutanten (Arginin^{277/292}→Glycin und Methionin^{333/348}→Valin) waren jedoch in der Lage, *in vitro* in der Gegenwart von NCAM zu polysialylieren. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Mutanten lässt sich ein Mechanismus ableiten, der zum einen N-Glykane in die Katalyse einbezieht und zum anderen das Dimer als aktive Einheit der Polysialyltransferasen ausschließt. In jedem Fall unterstreicht diese Arbeit die strenge Korrelation zwischen NCAM- und Autopolysialylierung. Desweiteren legt die Analyse der PST-Cysteinmutanten und Alkylierungsexperimente mit rekombinanter Wildtyp-PST die Existenz von zwei Disulfidbrücken zwischen Cystein¹⁴² und Cystein²⁹² bzw. Cystein¹⁵⁶ und Cystein¹⁶⁹ nahe.

Schlagworte: Polysialyltransferase, Polysialinsäure, NCAM

ABSTRACT:

Polysialic acid (Poly(α 2,8-Neu5Ac) or PSA) is involved in the regulation of cell-cell-interactions. PSA is posttranslationally added to the neural cell adhesion molecule (NCAM) and it is highly expressed during embryonic development. In the adult PSA is restricted to special brain areas in which neuronal plasticity takes place. Furthermore PSA is reexpressed in several highly malignant tumors. Two enzymes, the polysialyltransferases PST (ST8SiaIV) and STX (ST8SiaII) have been identified to catalyze the synthesis of PSA. Besides their ability to polysialylate NCAM both polysialyltransferases exhibit a second catalytic activity, which is autocatalytic polysialylation.

In 1995 the cDNA encoding the PST in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells was cloned. In this approach chemically mutated PSA negative CHO cells of the complementation group 2A10 were used to select the cDNA by complementation cloning. To gain insight into structure-function-relationships of polysialyltransferases the molecular defects in the PST genes that cause the PSA-negative phenotypes in 2A10 mutants have been analysed in detail. RT-PCR and sequencing of cDNAs revealed point mutations within the protein coding regions of 9 different 2A10 clones. In one clone an extended deletion was found. With a single exception point mutations lead to replacements of amino acids, which are highly conserved in α 2,8-sialyltransferases. In order to confirm the relevance of identified mutations for the biological activity of polysialyltransferases, these mutations were introduced into the wild type sequence of PST and related positions in STX were equally modified. Mutated PST and STX variants were expressed in transmembrane forms and as soluble proteins. The catalytic activities of these recombinant enzymes were tested *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, two mutations (arginine^{277/292}→glycine and methionine^{333/348}→valine) interfere with the autopolysialylation capacity of PST and STX, exclusively. A partial restoration of both NCAM- and autopolysialylation was observed, when recombinant enzyme forms were assayed *in vitro* in the presence of NCAM. Subcellular mistargeting of the variants was excluded by indirect immunofluorescence. In summary, the data suggests a new functional model for polysialyltransferases, which integrates *N*-linked oligosaccharides in the catalytic mechanism. In a second approach the functional relevance of cysteine residues was investigated by exchanges to alanine. The present data suggests the existence of two disulphide bonds in PST, one between cysteine¹⁴² and cysteine²⁹², the other between cysteine¹⁵⁶ and cysteine¹⁶⁹.

Keywords: polysialyltransferase, polysialic acid, NCAM

I EINLEITUNG

I 1 Sialinsäuren

I 1.1 Struktur

Unter dem Begriff "Sialinsäure" werden alle sauren Zucker mit insgesamt neun C-Atomen zusammengefasst. Die Carboxylgruppe am 2. C-Atom der als Pyranosen vorliegenden Sialinsäuren ist unter physiologischen Bedingungen deprotoniert und bedingt somit die negative Ladung dieser Kohlenhydrate. Der Großteil der Sialinsäuren trägt eine Aminogruppe am 5. C-Atom. In der am häufigsten vorkommenden Sialinsäure, der N-Acetylneuraminsäure oder kurz Neu5Ac liegt diese Aminogruppe acetyliert vor. N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) weist als Modifikation an dieser Position einen Glykolylrest auf [1,2]. Die deaminierte Form der Neuraminsäure wird als Ketodeoxynonulosonsäure (KDN) bezeichnet [3,4]. Die eben erwähnten Hauptformen der Sialinsäuren sind mit ihrer chemischen Struktur in Abb. 1 aufgeführt. Die Diversität der Sialinsäuren wird aufgrund von Substitution der Hydroxylgruppen durch Acetyl-, Lactyl-, Methyl-, Phosphat- und Sulfatgruppen enorm erhöht [5-7]. Bis jetzt sind mindestens 36 verschiedene Sialinsäurederivate bekannt (zur Übersicht siehe [8,9]).

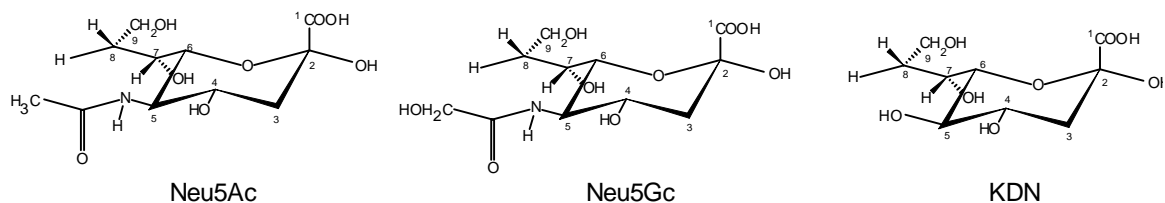


Abb. 1: Struktur von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) und Ketodeoxynonulosonsäure (KDN).

I 1.2 Vorkommen und Funktion

Sialinsäuren sind sowohl im Reich der Prokaryoten, Protozoen und Viren als auch bei den ein- und vielzelligen Eukaryoten weit verbreitet (zur Übersicht siehe [10]). Pflanzen weisen jedoch bis auf eine Ausnahme, den Buchweizen, keine Sialinsäuren auf (zur Übersicht siehe [11], Details in [12]). Allgemein kommen Sialinsäuren in Glykoproteinen und -lipiden als terminale Zucker vor. Sie sind gewöhnlich als Monomere über α 2,3- oder α 2,6-glykosidische Bindungen an Galaktose, N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) oder N-Acetylglucosamin (GlcNAc) gebunden. Darüber hinaus gibt es auch terminale di-, oligo- und polysialylierte O-

bzw. N-Glykanstrukturen [13]. Dabei gehen die Sialinsäuren untereinander α 2,8- oder α 2,9-glykosidische Verknüpfungen ein (mehr zu Polysialinsäure unter I 2). Allgemein sind Sialinsäuren aufgrund ihrer enormen Strukturdiversität und ihrer exponierten Lage auf Zelloberflächen an einer Vielzahl von spezifischen Erkennungsprozessen und Zell-Zell-Interaktionen beteiligt.

I 1.2.1 Prokaryonten, Protozoen und Viren

Im Reich der Prokaryonten kommen Sialinsäuren in verschiedensten Bakterien, wie z.B. in den pathogenen Neisserien, Salmonellen und *Escherichia coli*, aber auch im nicht toxischen *Rhodobacter* und *Rhizobium* vor (zur Übersicht siehe [10]). Die einzige in Bakterien vorkommende Sialinsäure ist Neu5Ac, die in einigen Fällen O-acetyliert vorliegt [14]. Sie ist auf den Oberflächen dieser Bakterien Bestandteil von Lipooligosacchariden (LOS), Lipopolysacchariden (LPS) oder Kapselpolysacchariden. Einige Bakterien besitzen eine Kapsel aus reinen Sialinsäurepolymeren (mehr dazu unter I 2.2.1). Diese sialylierten, bakteriellen Saccharide wirken nur schwach immunogen, da eine strukturelle Ähnlichkeit zu glykosylierten Wirtsproteinen, wie z.B. den Gangliosiden besteht.

Eine Besonderheit in der Klasse der Protozoen bilden *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* und *T. congolense*. Diese Trypanosomen können selber keine Sialinsäuren synthetisieren und haben daher eine einzigartige Strategie entwickelt, um diese aufzunehmen [15-17]. Sie exprimieren eine Transsialidase, welche Sialinsäuren aus exogenen Glykoproteinen des Wirtes, die sich z.B. auf der Oberfläche von Erythrozyten befinden, freisetzt. Nach der Inkorporation der Sialinsäuren können diese dann von den Trypanosomen direkt in eigene Akzeptoren eingebaut werden. Die nun sialylierten Oberflächen tragen zum Schutz der Pathogene vor den Abwehrmechanismen des Wirtes bei (zur Übersicht siehe [18,19]).

Auch in Oberflächenglykoproteinen von einigen Viren, wie z.B. Epstein-Barr [20], Herpes [21] oder HIV [22], wurden Sialinsäuren nachgewiesen.

I 1.2.2 Eukaryonten

Im Reich der Eukaryonten sind Sialinsäuren ausgehend von primitiven Organismen, wie den Echinodermaten (z.B. Seestern), bis hin zu den Vertebraten weit verbreitet (zur Übersicht siehe [14,23]). Auch einige pathogene Pilze, wie z.B. *Candida albicans*, exprimieren Neu5Ac auf ihrer Oberfläche und treten über diese in Interaktion mit dem Wirtsorganismus [24]. In Insekten konnten Sialinsäuren bislang nur in den Larven der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden [25]. Desweiteren wurden Sialinsäuren in Amphibien, Fischen, Vögeln und diversen Säugetieren nachgewiesen. Das Expressionsmuster der

verschiedenen Sialinsäurederivate ist dabei sowohl von der Spezies als auch von der Zellsorte, dem Gewebetyp und vom Entwicklungsstadium des Organismus abhängig. Durch maligne Transformation kann sich zudem die Expression der Sialinsäuren verändern [26].

Sialinsäuren erfüllen im Organismus unterschiedliche Funktionen. Zum einen tragen diese großen, hydrophilen und negativ geladenen Moleküle aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften unspezifisch zur negativen Aufladung von Zelloberflächen bei und führen damit zu einer Abschwächung der Zelladhäsion [27]. Zum anderen beeinflussen Sialinsäuren die Konformation von Glykokonjugaten. Dadurch erhöhen sie die thermische und strukturelle Stabilität von Glykoproteinen und vermindern die Gefahr einer proteolytischen Spaltung [28,29]. So sind z.B. die Glykoproteine der Magenschleimhaut (Mucine) von Vertebraten aufgrund ihrer zahlreichen wasser- und ionenbindenden Sialinsäuren in der Lage, ein hochviskoses Gel auszubilden, das die Schleimhaut vor den niedrigen pH-Werten im Magenlumen (pH 1-2) schützt [30,31]. Die in hohen Konzentrationen in der Magenschleimhaut vorhandenen Sialinsäuren werden häufig als Akzeptorstrukturen von Krankheitserregern, wie z.B. *Helicobacter pylori* benutzt [32,33].

Sialinsäuren spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Degradation von Glykoproteinen und Glykoprotein-tragenden Zellen in den Körperflüssigkeiten. Durch den Alterungsprozeß, der mit dem Abbau terminaler Sialinsäuren einhergeht, werden z.B. Galaktosen demaskiert. Die desialylierten Proteine binden dann in der Leber an den Asialoglykoproteinrezeptor, der speziell terminale Galaktosen erkennt. Daraufhin werden diese Proteine per Endozytose von den Hepatozyten aufgenommen und degradiert [34]. Die Entfernung von alten Erythrozyten aus dem Blut funktioniert z.B. nach diesem Prinzip [35,36].

Weiterhin werden durch Sialinsäuren auch hochspezifische Prozesse, wie Zell-Zell-Interaktionen reguliert. Ein Beispiel dafür ist die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut in entzündetes Gewebe. Dieser Prozess wird durch die Wechselwirkung der Leukozyten mit den Endothelzellen ausgelöst und als "Transmigration" bezeichnet. Für die direkte Interaktion sind u.a. die Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin auf den Endothelzellen verantwortlich, die höchstspezifisch die terminalen Tetrasaccharidstrukturen Sialyl-Lewis^x (Neu5Ac α 2,3-Gal β 1,4-(Fuc α 1,3)GlcNAc--) und Sialyl-Lewis^a (Neu5Ac α 2,3-Gal β 1,3-(Fuc α 1,4)GlcNAc--) auf Glykoproteinen von Leukozyten erkennen (zur Übersicht siehe [37,38]). Einige Parasiten, wie z.B. die Schistosomen, exprimieren das Sialyl-Lewis^x-Epitop und können dadurch die Produktion von Interleukin-10, das die T-Zell-spezifische Immunantwort unterdrückt, im Wirtsorganismus induzieren [39].

Eine weitere Gruppe von spezifisch an Sialinsäure bindenden Adhäsionsmolekülen bilden die Sialoadhäsiine oder Siglecs (zur Übersicht siehe [40,41]). Diese Moleküle werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, z.B. Makrophagen und B-Zellen, exprimiert und sind dort an der Blutbildung sowie an der humoralen und zellulären Immunantwort beteiligt [42]. Eine Ausnahme innerhalb dieser zur Immunglobulinsuperfamilie zählenden Gruppe mit insgesamt sieben Mitgliedern bildet das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG oder Siglec 4), das im Nervensystem die Myelinstruktur aufrechterhält und das Neuritenwachstum reguliert [43]. Da der Mensch im Laufe der Evolution im adulten Stadium die Fähigkeit zur Synthese von N-Glykolyneuraminsäure verloren hat, nimmt er u.a. bei durch Siglecs vermittelten Adhäsionsprozessen eine Sonderstellung ein (zur Übersicht siehe [44], Details in [45]).

Über die spezifische Bindung an Sialinsäuren, die in höheren Lebewesen universell und gewebspezifisch exprimiert werden, gelingt vielen Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen die gezielte Infektion von Organen [46]. Influenza Viren binden z.B. über ihr Oberflächenprotein Hemagglutinin hochspezifisch an N-Acetylneuraminsäure. Die Subklassen A und B bevorzugen dabei α 2,3- bzw. α 2,6-glykosidisch an Galaktose gebundene Neu5Ac, wohingegen das Influenza C Virus ausschließlich an 9-O-acetylierte Neu5Ac bindet. Die Viren werden dann nach Bindung an die Wirtszelle endozytiert (zur Übersicht siehe [47]). Auch vielen Bakterientoxinen, wie z.B. Botulinus-, Cholera- und Tetanustoxin, gelingt der Eintritt in die Zielzellen durch die Bindung an Sialinsäuren, die in diesen Fällen Bestandteil der Ganglioside GT1b, GM1 und GD3 sind [48-50].

I 1.3 Biosynthese und Aktivierung

I 1.3.1 Prokaryonten

Ausgangsprodukt zur Synthese der einzigen in Bakterien vorkommenden Sialinsäure, der N-Acetylneuraminsäure, ist hauptsächlich Glukosamin (GlcN), aber auch Glukose oder N-Acetylhexosamin. Im wichtigsten Syntheseweg wird GlcN zuerst zu GlcN-6-P phosphoryliert, anschließend mit Acetyl-CoA zu GlcNAc-6-P acetyliert und nach Isomerisierung zu GlcNAc-1-P mit Hilfe von UTP in die aktivierte Form UDP-GlcNAc überführt. Unter Abspaltung von UDP erfolgt dann die Epimerisierung zu N-Acetylmannosamin (ManNAc). Die Biosynthese von ManNAc ist bei Reutter *et al.* (1997) genauer beschrieben [51]. N-Acetylneuraminsäure wird nun direkt aus ManNAc und Phosphoenolpyruvat (PEP) mit Hilfe der aus *E.coli* K1 erst kürzlich klonierten Neu5Ac-Synthetase in einer temperaturabhängigen Reaktion gebildet [52,53]. Der Transfer der N-Acetylneuraminsäure auf die Glykokonjugate (siehe I 1.4) kann erst nach Aktivierung erfolgen. In einer von der CMP-Neu5Ac-Synthetase

katalysierten Reaktion wird aus Neu5Ac und CTP die aktivierte Form der N-Acetylneuraminsäure, CMP-Neu5Ac, gebildet. Die erste CMP-Neu5Ac-Synthetase wurde 1989 aus *E. coli* kloniert [54,55]. In den späten 90er Jahren folgten dann fünf weitere Sequenzen aus anderen Bakterienarten wie z.B. *Neisseria meningitidis* und *Helicobacter pylori* [56,57]. Die zur Synthese von CMP-Neu5Ac essentiellen Reaktionen sind in Abb. 2 zusammengefasst.

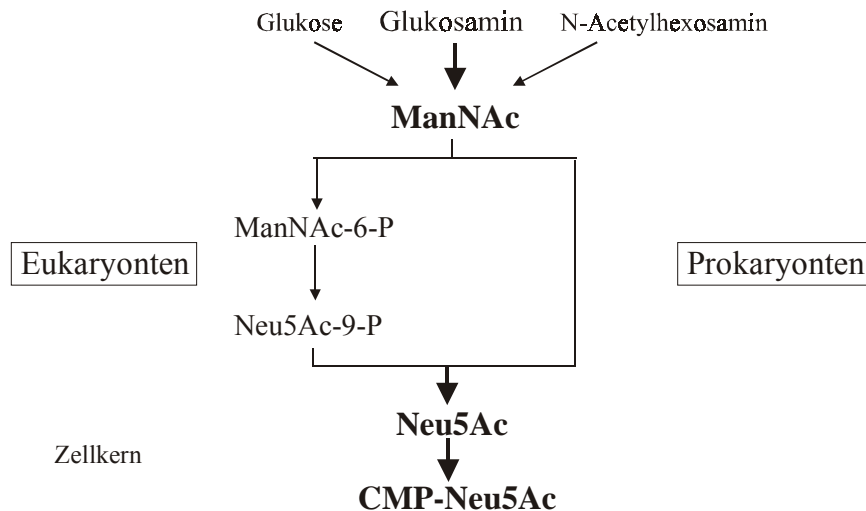


Abb. 2: Biosynthese von CMP-Neu5Ac in Pro- und Eukaryonten.

I 1.3.2 Eukaryonten

Die Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure weicht in Eukaryonten nur geringfügig von der in Prokaryonten ab (zur Übersicht siehe [51]). Die Addition von PEP erfolgt hier erst nach Aktivierung der ManNAc durch ATP. Diese Aktivierung wird von einem bifunktionellen Enzym, der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, die von aktivierter Neu5Ac allosterisch inhibiert wird, unter ATP-Verbrauch katalysiert [58,59]. ManNAc-6-P reagiert dann mit PEP zu Neu5Ac-P, das schließlich zu N-Acetylneuraminsäure dephosphoryliert wird. Die Synthese von CMP-Neu5Ac findet in Eukaryonten im Gegensatz zu den Reaktionen, die zur Synthese von Neu5Ac führen, und im Gegensatz zu allen anderen Reaktionen, in denen Zucker aktiviert werden, nicht im Zytoplasma, sondern im Zellkern statt. Die im Zellkern lokalisierte CMP-Neu5Ac-Synthetase wurde in den letzten 30 Jahren aus diversen Spezies isoliert, aber erst 1998 von A. Münster aus der Maus kloniert [60]. Die zur Synthese von CMP-Neu5Ac führenden Reaktionen sind in Abb. 2 zusammengefasst. Die aktivierte Sialinsäure muss im Anschluß aus dem Kern in das Lumen des Golgi-Apparates, wo der Transfer auf die Glykokonjugate und die Derivatisierung stattfindet (siehe I 1.4), transportiert werden. Der dafür verantwortliche CMP-Sialinsäure-Transporter wurde erstmalig 1996 von

M. Eckhardt aus Hamsterzellen kloniert [61]. O-Acetylierte Sialinsäurederivate werden ausgehend von Neu5Ac erst nach dem Transfer auf den Akzeptor (Glykoprotein oder -lipid) im Lumen des Golgi-Apparates gebildet [44,62,63]. Neu5Gc kann entweder durch direkte Reduktion des Acetylrestes durch die Neu5Ac-Monooxygenase oder *de novo* aus ManNAc synthetisiert werden [64,65]. KDN wird durch sequentielle Deacetylierung und Deaminierung ebenfalls aus Neu5Ac gebildet.

I 1.4 Sialyltransferasen

Der Transfer der N-Acetylneuraminsäure auf die entsprechenden Glykokonjugate wird sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten mit Hilfe von Transferasen durchgeführt, die bezüglich ihres Akzeptors und der katalysierten glykosidischen Bindung hochspezifisch sind.

I 1.4.1 Prokaryonten und Viren

In Prokaryonten wurden bis jetzt mehrere Monosialyltransferasen unterschiedlicher Spezifitäten, z.B. aus *Neisseria meningitidis* (α 2,3-glykosidische Bindungen), *Neisseria gonorrhoeae* (α 2,3-), *Haemophilus ducreyi* (α 2,6-) und *Photobacterium damsela* (α 2,6-) kloniert, in denen sie an der Synthese von Lipooligosacchariden beteiligt sind [66-69]. Auf die prokaryontischen Polysialyltransferasen, die für die Ausbildung von Polysaccharidkapseln verantwortlich sind, wird unter I 2.3.1 näher eingegangen. Alle prokaryontischen Sialyltransferasen sind peripher in der inneren Zellmembran verankert und weisen keine Homologie zu den eukaryontischen Sialyltransferasen auf. Auch aus einigen Viren konnten Gene für Sialyltransferasen kloniert werden, die aber im Unterschied zu den Enzymen aus Bakterien eine hohe Homologie zu den eukaryontischen Sialyltransferasen aufweisen. Die 1999 aus dem Myxomavirus klonierte α 2,3-Sialyltransferase (v-ST3GalI) besitzt zur humanen ST3GalIV eine Homologie von 43% und kann zusätzlich Sialyl-Lewis-Epitope synthetisieren [70,71].

I 1.4.2 Eukaryonten

Für landlebende Wirbeltiere sind bis jetzt mehr als 70 Sialyltransferasen aus unterschiedlichen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Hamster, Goldhamster, Schwein, Rind, Huhn, Ochsenfrosch) in der Sequenzdatenbank zu finden, von denen allerdings einige identisch sind. Im Anhang unter VI 3 sind alle bis jetzt bekannten Sequenzen der Sialyltransferasen dieser Spezies mit ihren Zugangsnummern in der Gendatenbank und Literaturangabe zusammengestellt. Diese Sialyltransferasen werden in vier Gruppen entsprechend ihrer Akzeptorstruktur und der glykosidischen Bindung, die sie katalysieren, eingeteilt. Eine Gruppe bilden die Enzyme, die Sialinsäure in einer α 2,3-glykosidischen Bindung auf Galaktose übertragen (ST3Gal). Eine

weitere Unterfamilie stellen die α 2,8-spezifischen Transferasen, die Sialinsäure auf terminale Sialinsäuren übertragen (ST8Sia). Die α 2,6-Sialyltransferasen bilden zwei Untergruppen, die zum einen Galaktose (ST6Gal) und zum anderen N-Acetylgalaktosamin (ST6GalNAc) als Akzeptor benutzen (zur Übersicht siehe [72]). In Tab. 1 sind die Kriterien, die zur Einteilung der Sialyltransferasen geführt haben, zusammen mit der Anzahl der bis jetzt bekannten Isoformen und den Hauptakzeptormolekülen aufgeführt. Die Sialyltransferasen der Subklassen ST8SiaII, III und IV katalysieren Polymerisationsreaktionen und sind unter I 2.3.2 näher beschrieben.

Sialyltransferasefamilie	Akzeptor (terminaler Zucker)	katalysierte Bindung	Isoformen	Akzeptor (Glykokonjugat)
ST3Gal	Galaktose	α 2,3	I, II, III	Glykolipide, O-Glykane
			IV	N-, O-Glykane, Glykolipide (Sialyl-Lewis ^X)
			V	Ganglioside (GM3-Synthese)
			VI	Glykoproteine und -lipide
ST6Gal	Galaktose	α 2,6	I	N-Glykane
ST6GalNAc	N-Acetylgalaktosamin	α 2,6	I	O-Glykane (Synthese von Sialyl-T ⁿ -Antigenen)
			II	O-Glykane
			III	Glykolipide (u.a. GM1b), O-Glykane
			IV	O-Glykane, Glykolipide
			V	Gangliosid GM1b (Synthese von GD1a)
			VI	Ganglioside (Synthese von GM1b, GT1b, GD1a)
ST8Sia	Sialinsäure	α 2,8	I	Ganglioside (GM3)
			II (STX) IV (PST)	N-Glykane, hauptsächlich NCAM (zu NCAM siehe I 2.2.2.1)
			III	N-Glykane, Ganglioside (GD1a, GT1b, GD3)
			V	Glykolipide, Ganglioside

Tab. 1: Einordnung der Sialyltransferasen in Untergruppen. Aufgeführt sind die verschiedenen Spezifitäten bezüglich der katalysierten glykosidischen Bindung, des als Akzeptor fungierenden terminalen Zuckers und des Akzeptorglykokonjugates.

I 1.4.2.1 Strukturmerkmale

Die Sialyltransferasen weisen wie alle Glykosyltransferasen eine Typ II-Membrantopologie auf (dargestellt in Abb. 3). Einem kurzen, zytoplasmatischen N-Terminus (1) folgt eine Transmembranhelix aus 16 bis 20 Aminosäuren (2), die dann in eine ausgedehnte, Protease-

sensible Stammregion mit mindestens 30 Aminosäuren (3) übergeht und schließlich die globuläre katalytische Domäne (4) ausbildet [73].

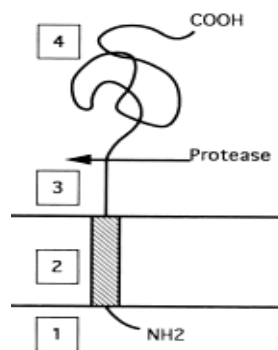


Abb. 3: Typ II-Membrantopologie der Sialyltransferasen (Darstellung aus [74]).

Anfang der 90er Jahre durchgeführte Sequenzvergleiche der Sialyltransferasen zeigten, dass innerhalb der katalytischen Domäne zwei Bereiche mit hoher Homologie (40-60%) existieren, die daraufhin Sialylmotive genannt wurden. Das N-terminal gelegene L-Sialylmotiv (L für ‚large‘) umfasst einen Bereich mit ca. 50 Aminosäuren, von denen acht invariant sind. Das S-Sialylmotiv (S für ‚small‘) besteht aus insgesamt 23 inklusive zwei invarianten Aminosäuren [75,76]. Diese Homologiebereiche ermöglichten mit Hilfe von degenerierten Primern und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gegen Ende der 90er Jahre die Klonierung einer Vielzahl von Sialyltransferasen. Spätere Homologievergleiche haben zusätzlich im C-terminalen Bereich der Sialyltransferasen zwei weitere invariante Aminosäuren nachgewiesen, die nur vier Positionen voneinander entfernt liegen und deswegen mit VS-Sialylmotiv (VS für ‚very short‘) bezeichnet wurden [77]. Mutagenesestudien an der ST6Gall aus der Ratte haben gezeigt, dass das L-Sialylmotiv an der Bindung des Donorsubstrates CMP-Neu5Ac und das S-Sialylmotiv sowohl an der Bindung des Donor- als auch des Akzeptorsubstrates, hier das asialo- α 1-saure Glykoprotein, beteiligt ist [78,79].

I 1.4.2.2 Intrazelluläre Lokalisation

Die Glykosyltransferasen sind entsprechend der Reaktion, die sie katalysieren, entlang des sekretorischen Weges vom Syntheseort der Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) bis hin zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert (zur Übersicht siehe [80]). Da Sialinsäuren die terminalen Strukturen der Glykokonjugate bilden, sind alle Sialyltransferasen im späten Golgi-Apparat (Trans-Golgi) oder dem TGN lokalisiert. Der Mechanismus, der für die Golgi-Retention der Sialyltransferasen verantwortlich ist, konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden (zur Übersicht siehe [81]). Die Existenz eines Signals, das für einen

durch Rezeptoren vermittelten Retentionsmechanismus nötig wäre, wie z.B. die Aminosäuresequenz K(H)DEL für die ER-residenten Proteine oder Mannose-6-Phosphat für lysosomale Proteine, kann für die Sialyltransferasen ausgeschlossen werden. Es werden zur Zeit zwei Modelle, die beide die Golgi-Retention der Sialyltransferasen beschreiben, diskutiert. Das ‚Oligomerization/kin-Recognition‘-Modell geht von Homo- und Hetero-Oligomerbildung der Sialyltransferasen aus. Diese Oligomere würden dann aufgrund ihrer Größe und/oder über Interaktion mit dem Zytoskelett nicht in die sekretorischen Vesikel gelangen. Die Existenz solcher Komplexe konnte aber bis jetzt nur in Einzelfällen nachgewiesen werden [82]. Das ‚Bilayer thickness‘-Modell sieht die Länge der Transmembranhelix als einziges Retentionssignal an, da die Membrandicke aufgrund des steigenden Cholesteringehaltes entlang des sekretorischen Weges stetig zunimmt und so eine Positionierung der Sialyltransferasen ermöglichen könnte. Intensive Mutagenesestudien an der ST6GalI aus der Ratte haben jedoch gezeigt, dass auch die flankierenden Bereiche der Transmembrandomäne, insbesondere die Stammregion, für die Golgi-Retention verantwortlich sind [83,84]. Da beide Modelle allein nicht in der Lage sind, die Golgi-Retention zu beschreiben, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Rückhaltemechanismen für die Golgi-residenten Proteine um sehr komplexe zell- und enzymespezifische Kombinationen beider Modelle handelt.

I 2 Polysialinsäuren

I 2.1 Struktur

Polysialinsäure (PSA) ist der Sammelbegriff für Homo- und Heteropolymere, deren Einzelbausteine Sialinsäuren sind (zur Übersicht siehe [85,86]). Ein Polymer kann dabei aus mehr als 200 Monomeren bestehen. Obwohl die Strukturdiversität bei den Monomeren sehr hoch ist, bestehen Polysialinsäuren hauptsächlich aus Neu5Ac, Neu5Gc und KDN (siehe Abb. 1), die auch O-acetyliert oder O-lactyliert vorliegen können. Poly(KDN) wird dabei oftmals als eigene Struktur innerhalb der Polysialinsäuren behandelt. Die Sialinsäuremonomere gehen untereinander ausschließlich α 2,8- und α 2,9-glykosidische Bindungen ein. Physikochemische Analysen haben ergeben, dass Polysialinsäuren in Lösung in helikaler Form, ähnlich wie Stärke oder Glykogen, mit ca. neun Monomeren pro Windung vorliegen [87]. Die Carboxylgruppe an C² ist dabei im Gegensatz zum Substituenten an der Aminogruppe von C⁵, welche aus der Helix herausragt, essentiell für diese Konformation [88]. Weiterhin konnte für PSA ab einer Anzahl von 11 Monomeren die Organisation in intermolekulare, filamentöse Aggregate, die zudem untereinander größere Netzwerke ausbilden, nachgewiesen werden [89].

I 2.2 Vorkommen und Funktion

Polysialinsäuren kommen sowohl in einigen Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor. Diese einzigartigen Polysaccharide liegen dabei entweder an Glykolipide oder über O- bzw. N-Glykane an Glykoproteine gebunden vor. Polysialinsäuren sind wegen ihrer enormen Polymerisationsgrade sehr große und wegen der multiplen negativen Ladungen zusätzlich stark hydrophile Moleküle, deren Raumanpruch durch die Hydrathülle noch erhöht wird. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Polysialinsäuren in der Lage, Zell-Zell-Interaktionen zu beeinflussen.

I 2.2.1 Prokaryonten

Viele humanpathogene Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* K1, *Pasteurella haemolytica* A2 und *Neisseria meningitidis* der Serogruppe B tragen eine Kapsel aus α 2,8-verknüpften Neu5Ac-Polymeren, die bei *E. coli* zudem Acetylgruppen an O⁷ und O⁹ aufweisen kann [90,91]. Der Träger der PSA ist hier ein Phospholipid [92]. Diese z.T. neuroinvasiven Keime werden vom Immunsystem des Wirtsorganismus nicht erkannt, da die PSA der Bakterienkapsel in ihrer Struktur identisch zur PSA des Wirtes ist. Zudem haben die negativ geladenen und stark hydratisierten Kapseln, wie am Beispiel der Neisserien bewiesen wurde, einen inhibitorischen Einfluß auf die Komplementaktivierung [93-95]. Neisserien der Serogruppe C, die sich aus der Serogruppe B durch horizontalen Transfer des C-Kapsel-kodierenden Operons entwickelt haben, bilden eine Kapsel aus Neu5Ac-Polymeren mit α 2,9-glykosidischen Bindungen [96]. Da diese Struktur vom Wirtsorganismus nicht exprimiert wird, wirken Neisserien der Serogruppe C immunogener und lassen die Entwicklung von effektiven Impfstoffen zu. Die *E. coli* Stämme K92 und Bos-12 weisen eine besondere Form von Neu5Ac-Polymeren mit alternierenden α 2,8- und α 2,9-glykosidischen Bindungen auf [97]. Polymere aus Neu5Gc oder KDN wurden in Bakterien bis jetzt noch nicht nachgewiesen. Zum Auslösen einer Infektion müssen die verkapselten Bakterien durch die Epithelien in das Blutgefäßsystem des Wirtsorganismus gelangen. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bislang nur für Neisserien der Serogruppe B aufgedeckt werden. Zur Adhäsion an die Epithelzellen und zum Eindringen in diese werden die Gene zur Kapselsynthese durch reversible Insertion vorübergehend deaktiviert. Nach dem Eintritt in die Blutgefäße kann die schützende Kapsel, die über einen bislang unbekanntem Mechanismus die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht, wieder ausgebildet werden [98,99].

I 2.2.2 Eukaryonten

Bei den Eukaryonten wurden Polysialinsäuren bislang außerhalb der Gruppe der Säugetiere in einem speziellen Entwicklungsstadium von *Drosophila melanogaster* [25], in *Xenopus laevis* [100], in Hühnern [101] und in mehreren Fischen nachgewiesen. In unbefruchteten Eiern der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) wurde 1978 erstmals die Existenz von Polysialinsäure in Eukaryonten beschrieben [102]. In späteren Studien konnte diese Struktur eindeutig als α 2,8-verknüpftes Polymer aus Neu5Gc, das über O-Glykane an Polysialoglykoproteine (PSGP) gebunden war, identifiziert werden. Insgesamt exprimieren die Fische innerhalb der Wirbeltiere die größte Vielfalt an Polysialinsäuren. Neben der zuvor erwähnten Struktur kommen in Eiern einer anderen Forellenart zusätzlich reine α 2,8-Neu5Ac-Polymere vor [6]. Aus der Vitellinschicht und den Kortikalvesikeln von Eiern aus Salmoniden konnte später eine Vielzahl von Heteropolymeren, die aus unterschiedlich substituierten KDN-Derivaten aufgebaut sind und zudem verschiedene glykosidische Bindungen aufweisen, isoliert werden (zur Übersicht siehe [85]). Der Polymerisationsgrad dieser Sialinsäureketten liegt im Durchschnitt bei sechs und im Maximum bei 24 [103,104]. Die Sialinsäurepolymere auf den Oberflächen der Salmonideneier sind neben ihren unspezifischen protektiven Eigenschaften bezüglich mechanischen, osmotischen, proteolytischen oder bakteriellen Schädigungen [105] auch an spezifischen Zell-Zell-Interaktionen, wie z.B. der Bindung des Spermiums während der Fertilisation oder Zellmigrationsprozessen während der frühen Embryogenese [106,107] beteiligt. Bei den Säugetieren sind Polysialinsäuren weit verbreitet. Sie konnten in der Maus, der Ratte, diversen Hamsterarten, Affen und dem Menschen nachgewiesen werden. In allen Wirbeltieren, mit Ausnahme der zuvor beschriebenen Fische, kommen ausschließlich α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Homopolymere vor. Diese sind in den meisten Fällen über komplexe N-Glykanstrukturen mit dem Neuralem Zelladhäsionsmolekül (NCAM) verbunden. Im Gehirn der Ratte und im Zitteraal (*Electrophorus electricus*) konnte diese Form der Polysialinsäure jedoch auch als posttranslationale Modifikation der α -Untereinheit der Natriumkanals nachgewiesen werden [108,109].

I 2.2.2.1 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)

NCAM wurde 1977 in Netzhautgeweben von Hühnerembryonen erstmals beschrieben [110]. Es ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das in drei Hauptisoformen mit 120, 140 und 180 kDa vorkommt, wobei die kleinste Form über einen GPI-Anker in der Membran fixiert ist. Neben den membranständigen NCAM-Varianten gibt es eine weitere lösliche Isoform mit 110 kDa, die von den Zellen sezerniert wird. NCAM gehört zur Immunglobulinsuperfamilie,

da es neben zwei zu Fibronectin-Typ III homologen Bereichen auch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält (zur Struktur und Funktion von NCAM siehe [111,112]). NCAM, das in Abb. 4 dargestellt ist, besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen der Aminosäuresequenz „Asparagin - X - Serin/Threonin“, von denen aber nur zwei in der fünften Ig-ähnlichen Domäne (Asparagin⁴³⁰ und Asparagin⁴⁵⁹) gegebenenfalls polysialyliert vorliegen [113]. Der Polymerisationsgrad der PSA liegt z.B. in humanen Neuroblastomzellen bei 55 [114], kann aber auch Werte um 200 erreichen.

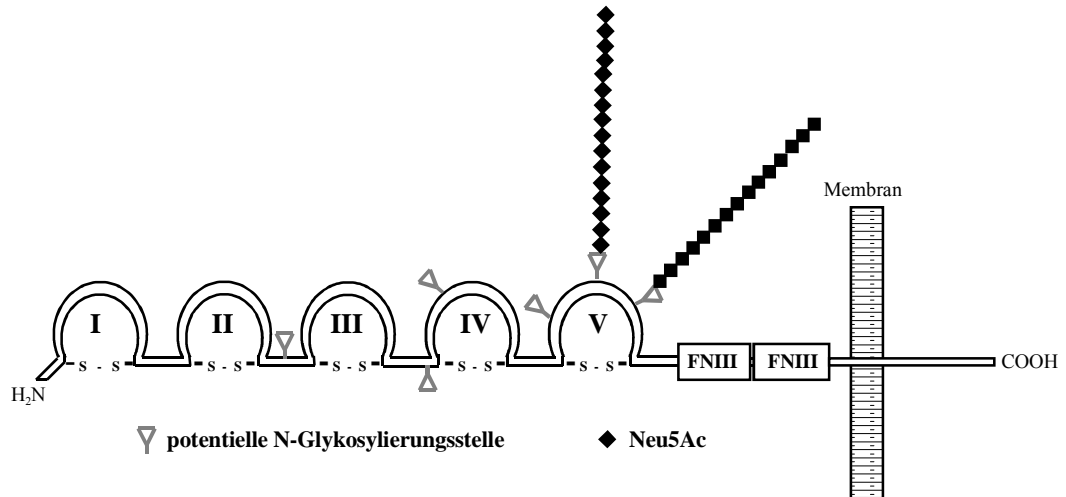


Abb. 4: Schematische Darstellung von NCAM-140 in polysialyliertem Zustand. Aufgeführt sind alle sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Ig-ähnliche Domänen sind mit römischen Zahlen bezeichnet und FNIII steht für Fibronectin-Typ III-homologe Domäne.

Die Kohlenhydratstruktur, über die PSA mit dem Proteingerüst des NCAMs verbunden ist, konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die von Finne und Mäkelä (1985) postulierte Struktur ist in Abb. 5 dargestellt [115]. Neuere Analysen ergaben, dass mehrere GlcNAc-Moleküle in diesen Kohlenhydratstrukturen als mögliches Polysialylierungssignal Sulfatgruppen tragen [116].

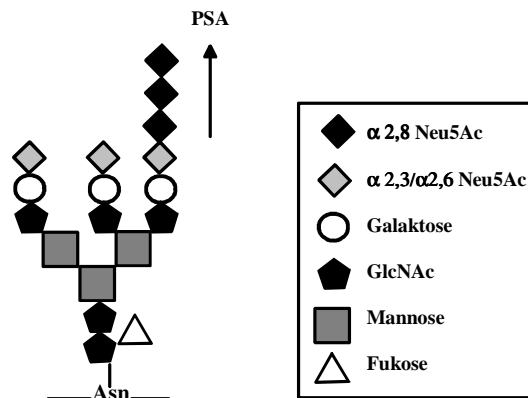


Abb. 5: Hypothetische Struktur des PSA-tragenden Kohlenhydratgrundgerüsts nach Finne und Mäkelä (1985) [115].

Die Expression von polysialyliertem NCAM (PSA-NCAM) ist entwicklungs- und gewebespezifisch streng reguliert (zur Übersicht siehe [117]). PSA-NCAM kommt hauptsächlich in neuronalen Geweben während der Embryogenese, aber auch im adulten Organismus und in anderen Geweben, wie z.B. dem Muskel vor. NCAM ist durch die Ausbildung von homophilen Interaktionen an Zell-Zell-Adhäsionsprozessen beteiligt, wie u.a. Studien mit NCAM-tragenden Liposomen, die durch eine Verdoppelung der NCAM-Dichte eine Verdreißigfachung der Aggregationsrate zeigten, bewiesen haben [118]. Desweiteren wurden aber auch heterophile Wechselwirkungen mit Heparin- und Chondroitinsulfaten von Proteoglykanen (HSGPs) in der Extrazellulärmatrix beobachtet [119]. Durch die Expression von PSA werden diese homo- und heterophilen Bindungen geschwächt oder aufgehoben. Lichtstreuungsexperimente haben gezeigt, dass sich der Raumanpruch des NCAMs durch PSA auf das Dreifache erhöht und es zu einer Aufweitung des intrazellulären Spaltes kommt [120]. Durch die Regulation des PSA-Gehaltes von Zelloberflächen und die damit verbundenen Auswirkungen auf die zelluläre Motilität wird eine Vielzahl von Zellmigrations- und Differenzierungsprozessen beeinflusst. PSA-NCAM ist während der Embryonalentwicklung massgeblich am Auswachsen [121], an der Verzweigung [122] und der Bündelung ("Faszikulation") [123,124] von Neuriten, sowie an der Ausbildung von stabilen synaptischen Kontakten bei der Innervation von Muskelzellen [125] beteiligt. Im adulten Organismus ist die Expression von PSA-NCAM auf Gebiete mit permanenter neuronaler Plastizität und Neurogenese, wie z.B. den Hippocampus und den Hypothalamus, beschränkt [126,127]. In diesen Bereichen konnte eine Beteiligung von polysialyliertem NCAM an Lern- und Gedächtnisfunktionen [128,129] sowie an neuroendokrinen Prozessen, wie der Synchronisation des zirkadianen Rhythmus [130], nachgewiesen werden. Desweiteren wurde PSA-NCAM als Oberflächenstruktur in verschiedenen neuroendokrinen und lymphoiden Tumoren, wie z.B. dem Wilms-Tumor [131], dem Neuroblastom [132] und malignen Lymphomen [133] beschrieben. In den meisten Fällen existiert dabei eine strenge Korrelation zwischen PSA-Gehalt und Malignität [134]. Dieses Phänomen könnte auf den antiadhäsiven Eigenschaften der PSA beruhen, welche die Ablösung der Zellen vom Primärtumor und somit die Bildung von Metastasen erleichtern.

I 2.3 Polysialyltransferasen

Die Biosynthese der Polysialinsäuren aus den jeweiligen Sialinsäuremonomeren wird von Polysialyltransferasen katalysiert. Der zugrunde liegende Mechanismus unterscheidet sich bei den Pro- und Eukaryonten erheblich. Zudem zeigen die entsprechenden Transferasen keine Homologie auf Proteinebene.

I 2.3.1 Prokaryonten

Die Synthese von Polysialinsäure wird im folgenden am Beispiel von *E. coli* K1 erläutert (ausführliche Beschreibung in [85,135]). Die initiale Reaktion besteht aus dem Transfer einer N-Acetylneuraminsäure von CMP-Neu5Ac auf Unadecaprenylphosphat (P-C₅₅), ein Phospholipid der inneren Zellmembran. Die Elongation findet durch den sukzessiven Transfer der N-Acetylneuraminsäure von Neu5Ac-P-C₅₅ auf das wachsende (Neu5Ac)_n-P-C₅₅-Polymer statt. Die sich im Zytoplasma der Bakterien befindende und an P-C₅₅ gebundene PSA-Kette muss schließlich auf einen endogenen Akzeptor übertragen und durch die Zellmembran zur Außenseite der Bakterien transloziert werden. Alle zur PSA-Synthese benötigten Gene sind im *kps*-Genkomplex kodiert. Dieser ist in drei Regionen unterteilt und umfasst insgesamt 16 bis 19 kb, die mehr als 12 Proteine kodieren. In Region 2 sind mindestens sechs für die Synthese von PSA benötigte Enzyme (*neuA/B/C/D/E/S*) lokalisiert, von denen *neuE* die Initiation und *neuS* die Elongation ausführen. Die flankierenden Regionen 1 und 3 beinhalten u.a. die Gene zur Translokation (*kpsM* und *kpsT*) [136]. Eine Besonderheit innerhalb der prokaryontischen Polysialyltransferasen stellt das Enzym aus *E. coli* Bos-12 dar, das alternierende α 2,8/ α 2,9-Neu5Ac-Polymere synthetisiert [97]. Diese Polysialyltransferase überträgt präformierte α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Dimere in α 2,9-glykosidischer Bindung auf das nicht-reduzierende Ende der wachsenden PSA-Kette.

I 2.3.2 Eukaryonten

Der entscheidende Durchbruch zur Aufklärung der Biosynthese von PSA gelang 1995 durch die Klonierung der ersten eukaryontischen Polysialyltransferase aus dem Hamster, die mit "PST-1" oder allgemein mit "PST" bezeichnet wurde [137]. Kurz darauf wurden homologe Enzyme aus der Maus, der Ratte, dem Menschen und dem Huhn kloniert [138-140]. Schon 1993 war die Klonierung einer Sialyltransferase aus der Ratte gelungen, deren Funktion aber zu dem Zeitpunkt unbekannt war und die deswegen als "STX" bezeichnet wurde [75]. Die weitere Charakterisierung und die spätere Klonierung homologer Enzyme aus der Maus und dem Menschen ließen die eindeutige Zuordnung zur Gruppe der Polysialyltransferasen zu [141,142]. Die Polysialyltransferasen zeigen alle Charakteristika der Sialyltransferasen, die unter I 1.4.2 näher beschrieben sind. Entsprechend der 1996 eingeführten Nomenklatur wurden die zur STX homologen Enzyme mit ST8SiaII und die der PST entsprechenden Enzyme mit ST8SiaIV bezeichnet [143]. Es existieren somit zwei Enzyme, die in der Lage sind, ohne die Hilfe eines weiteren Enzyms α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Polymere an NCAM zu synthetisieren. Als Akzeptor kann dabei sowohl α 2,3- als auch α 2,6-verknüpfte terminale

Galaktose dienen [144]. 1996 wurde erstmalig die Fähigkeit der Polysialyltransferasen, PSA *in vitro* in einer autokatalytischen Reaktion an sich selbst zu synthetisieren, beschrieben [145]. Spätere Studien zeigten, dass beide Enzyme auch *in vivo* enzymgebundene PSA-Ketten tragen [146]. Ob es sich bei dieser Autopolysialylierung um eine inter- oder intramolekulare Reaktion handelt, konnte bis heute jedoch nicht geklärt werden. Desweiteren existieren kontroverse Ansichten darüber, ob die Automodifikation für die Polysialylierung von NCAM essentiell ist. Obwohl ein ‚*en bloc*‘-Transfer von präformierten PSA-Ketten von der PST auf NCAM ausgeschlossen werden kann, spricht die Tatsache, dass agalacto-PST im Gegensatz zur voll aktiven asialo-PST nicht mehr in der Lage ist, sich selbst und NCAM zu polysialylieren, für die elementare Bedeutung der Autopolysialylierung [145]. Eine andere Arbeitsgruppe kommt dagegen nach Studien an N-Glykosylierungsmutanten der PST zu dem Schluss, dass Autopolysialylierung keine Voraussetzung für die Polysialylierung von NCAM ist, diese jedoch verstärkt [147]. Neueste Studien zeigen, dass auch die ST8SiaIII zu den Polysialyltransferasen gezählt werden muss, da dieses Enzym ebenfalls in der Lage ist, sich zu autopolysialylieren [148]. Gegenüber NCAM zeigt es jedoch keinerlei Polysialylierungsaktivität. Bislang galt ST8SiaIII als reine Mono- bzw. Oligosialyltransferase, die sowohl Glykoproteine als auch Glykolipide, wie z.B. GM3, als Akzeptor benutzt [149,150].

I 2.3.2.1 Unterschiede zwischen PST und STX

Die Expressionsmuster für PST und STX zeigen Unterschiede auf mRNA-Ebene. Studien an Mausembryonen haben gezeigt, dass STX und PST abhängig vom Gewebe und vom Entwicklungszustand unterschiedlich exprimiert werden [151]. STX wird am stärksten in Lunge und Testes und schwach auch im Gehirn exprimiert. PST dagegen wird hauptsächlich in Herz und Lunge, geringfügig auch in Muskel und Gehirn nachgewiesen. Untersuchungen an adulten menschlichen Geweben zeigten zudem, dass in Niere, Dünndarm und in peripheren Leukozyten ausschließlich PST exprimiert wird [152,153]. Beide Polysialyltransferasen werden in der Maus ab Tag 8 der Embryonalentwicklung (E8) exprimiert. Die Expressionshöhe der STX unterliegt dabei deutlicheren Schwankungen als die der PST. Sie nimmt bis E12 stark zu, bleibt bis E15 auf diesem Niveau, fällt dann bis zum postnatalen Tag 10 (P10) auf ca. 1/4 ab und ist im adulten Tier (>P26) nicht mehr nachzuweisen. Die Transkription von PST wird dagegen nur moderat hochreguliert, erreicht aber zur maximalen Expression an E12 ungefähr die gleiche Intensität wie STX, fällt dann bis P10 langsam auf ca. die Hälfte ab und persistiert im Unterschied zu STX im adulten Tier auf diesem Niveau [151]. Eine äquivalente Studie bestätigt zwar die zuvor geschilderten Expressionsprofile, kommt aber bei dem

Vergleich der Expressionshöhen zu dem Schluss, dass STX an E12 in 10fachem Überschuss vorliegt [154].

PST und STX unterscheiden sich auch in ihren Affinitäten für die verschiedenen NCAM-Isoformen [155]. STX bevorzugt NCAM-140 und NCAM-180, PST dagegen polysialyliert vornehmlich NCAM-120 und NCAM-140. Studien an N-Glykosylierungsmutanten von NCAM wiesen zudem der humanen PST eine Präferenz für die 6. und der humanen STX eine Präferenz für die 5. N-Glykosylierungsstelle zu [156]. Diese und andere Studien kommen weiterhin übereinstimmend zu dem Schluss, dass PST das prozessivere Enzym darstellt und somit deutlich längere PSA-Ketten synthetisiert als STX [148,152,155,157]. Aufgrund der Unterschiede in der Expression, den Akzeptorspezifitäten und der Prozessivität liegt der Schluss nahe, dass beide Polysialyltransferasen unterschiedlich reguliert werden und individuelle Funktionen im Organismus ausüben. Da PST und STX aber auch innerhalb einer Zelle exprimiert werden, könnten sie sich hier gegenseitig ergänzen und kooperativ in die Polysialylierung eingreifen.

I 3 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit lagen über strukturbestimmende und aktivitätsrelevante Elemente der eukaryontischen Polysialyltransferasen PST und STX keine experimentellen Daten vor. Homologievergleiche hatten gezeigt, dass beide Enzyme alle Charakteristika der Sialyltransferasen aufweisen. Polysialyltransferasen besitzen somit eine Typ II-Membrantopologie und enthalten die hochkonservierten Sialylmotive L, S und VS. Am Beispiel der Mono-sialyltransferase ST6GalII konnte nachgewiesen werden, dass das L-Sialylmotiv essentiell für die Bindung des Donorsubstrates CMP-Neu5Ac und das S-Sialylmotiv sowohl an der Bindung des Donor- als auch des Akzeptorsubstrates beteiligt ist. Zwei in den Sialyltransferasen auftretende hochkonservierte Cysteine, deren Beteiligung an einer Disulfidbrücke schon mehrfach postuliert aber nie bewiesen wurde, sind ebenfalls in den Polysialyltransferasen vorhanden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Primärstrukturelemente in den Polysialyltransferasen zu identifizieren, die an der Ausbildung einer funktionellen Konformation massgeblich beteiligt sind. Ein geeignetes Fundament für diese Struktur-Funktionsanalyse bildete die Komplementationgruppe 2A10, deren Klone aufgrund eines Defektes im PST-Gen ihre Fähigkeit zur PSA-Synthese verloren haben. Durch die molekulare Analyse der PST-mRNAs aus diesen Klonen sollten essentielle Aminosäuren oder Sequenzabschnitte identifiziert werden. Die weitere Charakterisierung der Mutanten durch *in vivo*- und *in vitro*-Aktivitätstests sollte dann Informationen über einen möglichen Katalysemechanismus liefern. Nach der Übertragung der 2A10-Mutationen in die STX, sollten die entsprechenden STX-Mutanten ebenfalls analysiert und die Ergebnisse in Relation zur PST gestellt werden.

Ein weiterer Zugang bestand in der gezielten Mutagenese von hochkonservierten Aminosäuren der Polysialyltransferasen, wie z.B. den Cysteinen. Mit dieser Analyse sollten Rückschlüsse auf die Disulfidbrückenstruktur der Polysialyltransferasen möglich werden.

II MATERIAL UND METHODEN

II 1 Material

II 1.1 Zelllinien

- CHO-K1 (C6) : Hamster-Ovarien-Zelllinie, Subklon C6 (ATCC CRL 9618)
- COS-1 : Affen-Nieren-Zelllinie (CV-1-Fibroblasten), transformiert mit SV40 (ATCC CRL 1650)
- NIH 3T3 : Maus-Fibroblasten-Zelllinie (ATCC CRL 1685)
- Komplementationsgruppe 2A10 (Subklone: 1C5, 1D7, 1E6, 1G4, 1H8, 2A10, 2B12, 2D5, 2D8, 2E11, 2G8, 3A7, 3C7, 3F3, 4C4, 4D11, 4E8, 5C3, 5C9, 5F4, 6B8, 6E5, 7F11, 7G11, 7G9, 8C6, 8F8, 8G5, 9C8, 9D8, 9G2) :
CHO-K1-Zellen, die nach chemischer Mutagenese aufgrund eines defekten PST-Gens keine PSA-Expression aufweisen [137].
- Komplementationsgruppe Lec 2 (Subklone 1E3, 8G8) :
CHO-K1-Zellen, die aufgrund eines defekten CMP-Neu5Ac-Transporter-Gens keine PSA-Expression aufweisen [158].
- 2A10-ProtA-NCAM : 2A10-Zellen (Subklon 2A10 der Komplementationsgruppe 2A10), stabil transfiziert mit ProtA-NCAM (Fusionsprotein aus dem IgG-bindenden Teil von ProteinA und NCAM-140, Plasmid: pBT4)
- 2A10-PST-MH : 2A10-Zellen (s.o.), stabil transfiziert mit PST-MycHis (Fusionsprotein aus Hamster-PST und MycHis-Epitop am C-Terminus, Plasmid: pPST-MycHis)
- 2A10-STX-MH : 2A10-Zellen (s.o.), stabil transfiziert mit STX-MycHis (Fusionsprotein aus Maus-STX und MycHis-Epitop am C-Terminus, Plasmid: pSTX-MycHis)
- 9E10 : Maus-Hybridom, das den anti-Myc-Antikörper 9E10 (IgG1) sezerniert [159].

II 1.2 Zellkulturmedien und –zusätze

α –MEM	GibcoBRL
DMEM	Seromed
DMEM HAM's F12	Seromed
SMIF	GibcoBRL
OptiMEM	GibcoBRL
HybridoMED DIF	Seromed
Fötale Kälberserum	GibcoBRL/Sigma
L-Glutamin (200 mM)	GibcoBRL
Natriumpyruvat (100 mM)	GibcoBRL
Penicillin (5000 U/ml) / Streptomycin (5000 U/ml)	GibcoBRL
Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA in Hepes-Puffer)	GibcoBRL
HT-Zusatz (50x): Hypoxanthin (5 mM) / Thymidin (0,8 mM)	GibcoBRL

II 1.3 Bakterienstamm

- E. coli* DH5 α : F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZY-A-argF)U169, recA, endA1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁻), supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA, relA1

II 1.4 Bakterienmedien

LB-Medium	: 1% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,5
LB-Agar-Platten	: LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

II 1.5 Oligonukleotide und Primer

Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit u.a. für das Einbringen von Epitopsequenzen in Vektoren verwendet. Primer sind Oligonukleotide, die bei der zielgerichteten Mutagenese mittels PCR, bei der RT-PCR und bei Sequenzierungen eingesetzt wurden. Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech und MWG Biotech bezogen. Die folgenden Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung aufgeführt. Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt.

Epitop-kodierende Oligonukleotide:

	Sequenz
HABgl2s	<i>GAT CTT ACC CTT ATG ACG TCC CCG ATT ACG CCA GCC TGC</i>
HANot1as	<i>GGC CGC AGG CTG GCG TAA TCG GGG ACG TCA TAA GGG TAA</i>
FlagM5s	<i>CGC CAC CAT GGA CTA CAA GGA TGA TGA TGA TAA GG</i>
FlagM5as	<i>GAT CCC TTA TCA TCA TCA TCC TTG TAG TCC ATG GTG GCG GTA C</i>

RT-PCR-, PCR- und Sequenzierprimer:

	Sequenz	Ziel
KB9	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	Vektor
BGH	TAG AAG GGC ACA GTC GAG G	Vektor
AB6	GCT CTA GAT TAT TGC TTC ATG CAC TTC	PST
AH29	TTG CTT CAT GCA CTT CCC TG	PST
AH30	TCC ACG CTC CCT TCG CAA	PST, 5'-UTR
CB14	TTT AAA GTT CTT GGA TGC	STX
CB15	GTC ATA ATA GTG ATA CTT G	STX
CB34	CTC GGT CAT CCA GCG GGC CTT T	STX
MA11	CCG TAC GAA GCT TGG TA	pSecTag B
MA26	ACA CCT ACT CAG ACA ATG	pSecTag B
ME17	ACG TGA TGT CTC TGT GG	PST
ME21	ATG CGC TCC ATT AGA AAA CGG	PST
ME22	TTA TTG CTT CAT GCA CTT CCC TGT GGT	PST
ME25	AGT TTG CTG CGG ATG TG	PST
ME51	GAC CTG ATT CTG GGA TCT CGG	PST, 5'-UTR
ME52	GGT GGA TTC CCA TGG ACT TCC	PST, 3'-UTR
ME53	AAG AGA AGG TGC CGG AGC TG	PST, 5'-UTR
ME54	GAT GCT GAA CCC CAG CCT TG	PST, 3'-UTR
MM17	TTG CTT CAT GCA CTT CCC	PST
MM24	GCT CTA GAT TAT TGC TTC ATG CAC T	PST
MM26	GAA GAT CTG CCA GAA CTG AGG AGC AC	PST
MM29	CGC TGA TCA GTC GAC ATC GGG AAT TCT GGA GGC	STX
MM30	GCT CTA GAC GTA GCC CCA TCA CAC TG	STX
MM32	GCT CTA GAT TAC GTA GCC CCA TCA C	STX
MW5	CCG CTC GAG CGC TCC ATT AGA AAA CGG	PST
MW6	<i>GCT CTA GAT TAT TGC TTC ATG AAC TTC CCT</i>	PST/C356F

	Sequenz	Ziel
MW7	CCT GTT TCT AAA TCT CCA GAA GC	PST
MW18	GGG <i>GTA</i> CCT TGA GCA GAT CAC TTG TC	PST
MW19	GGG <i>GTA</i> CCG CTG GCT CAA CCA TCT TC	PST
MW28	CCG <i>CTC</i> GAG CAG CTG CAG TTC CGG AGC	STX
MW29	GCT <i>CTA</i> GAT TAC GTA GCC CCA TCA AAC	STX/C371F

Mutageneseprimer für Maus-STX:

	Sequenz	Mutation
MA16	CGA GTT TTC CAC GAT GGC	G161E
MA17	CCA TCG TGG AAA ACT CGG G	G161E
MA18	CAA GAG GCT GGT GGT TG	G296S
MA19	CAA CCA CCA GCC TCT TGA T	G296S
MW20	GAC CTA GTG ATC ATG AAC C	T204I
MW21	GGG GTT CAT GAT CAC TAG	T204I
MW22	CAC ATC AAA GGA CCA ACC	R292G
MW23	GTG GTT GGT CCT TTG ATG	R292G
MW24	CCA CAC CGT GCC CTT G	M348V
MW25	CCA AGG GCA CGG TGT G	M348V
MW26	CGG CCA GTT TGA TGG G	C371F
MW27	GCC CCA TCA AAC TGG CC	C371F
MW32	GCC CTT GAA ATT CAA GG	E351K
MW33	GGC CTT GAA TTT CAA GG	E351K
MW41	GGC CTC TTG ATA TAC ACC	M299I
MW42a	CAG GGT GTA TAT CAA GAG	M299I

Mutageneseprimer für Hamster-PST:

	Sequenz	Mutation
MA20	ATC AAA GGA CCC AGC AC	R277G
MA21	GCT GGG TCC TTT GAT GG	R277G
MA22	TTC ATG GCC AAA GGA GGA	V230A
MA23	TCC TTT GGC CAT GAA AGC	V230A
MA24	GGG AAG TTC ATG AAG CAA	C356F
MA25	CTT CAT GAA CTT CCC TGT	C356F
MW8	GGT TTA AGA CCG CTG CTG TTG	C142A
MW9	CAA CAA CAG CAG CGG TCT TAA A	C142A
MW10	GAC AGT GGA GCT GGC AAG G	C156A
MW11	CTC CTT GCC AGC TCC ACT G	C156A
MW12	GTA ATC AGG GCC AAT CTA GCT	C169A
MW13	GAG CTA GAT TGG CCC TGA TTA	C169A
MW14	CAC CAG ATT TGC TGA TGA AAT TC	C292A
MW15	GTG AAT TTC ATC AGC AAA TCT GG	C292A
MW16	CCA CAG GGA AGG CCA TGA AG	C356A
MW17	GCT TCA TGG CCT TCC CTG TG	C356A
MW30	GAA TGC CAT TAA AAT TCA AAA	E336K
MW31	GGG TTT TGA ATT TTA ATG G	E336K
MW34	GCC TCC TCA TAT ACA CAC	M284I
MW35	CCA GTG TGT ATA TGA GGA G	M284I

	Sequenz	Mutation
MW36	GCA TGA AGC GAT CTA GAG	Q359R
MW37	CCT CTA GAT CGC TTC ATG	Q359R
MW38A	GC TCTAGA CTT ACT GCA CTT CCC TG	K358stop
MW39	CAG GGA AGA GCA TGA AG	C356S
MW40	GCT TCA TGC TCT TCC C	C356S
MW43	CTC ACA GAC TGC CAT TAG	M333L
MW44	ATT CTA ATG GCA GTC TGT G	M333L
MW45	GCT CTA GAG GCG CAC TTC CCT GTG GTC AG	M357Astop
MW46	GCT CTA GAG CAC TTC CCT GTG GTC AG	C356stop

II 1.6 Vektoren und Plasmide

pBlueScript SK(-)	: Klonierungsvektor und prokaryontischer Expressionsvektor (Stratagene)
pcDNA3	: eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pSecTag B	: eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pGEM-T Vektor	: Dieser bereits linearisierte Vektor kann direkt zur Ligation von PCR-Fragmenten mit 3'A-Überhängen, welche z.B. durch PCR mit <i>Taq</i> -DNA-Polymerase entstehen, benutzt werden (Promega).
pME7	: eukaryontischer Expressionsvektor (pABE) mit der vollständigen cDNA der Hamster-PST
pAH24	: pBlueScript SK(-) mit kodierender Sequenz der Hamster-PST
pBS _m STX	: pBluescript SK(-) mit vollständiger cDNA der Maus-STX
pBT4	: Dieses auf dem eukaryontischen Expressionsvektor pProTA basierende Plasmid kodiert ein Fusionsprotein aus NCAM-140 und dem IgG-bindenden Teil von ProteinA.
pCMVlacZ	: Dieses Plasmid enthält das Gen für die β -Galaktosidase und wird zur Überprüfung der Transfektionseffizienz benutzt.
pBS/GAPDH	: pBlueScript SK(-) mit GAPDH-Sequenz der Ratte
pFlagB1	: Dieser Vektor unterscheidet sich von pcDNA3 nur durch die über die Restriktionsschnittstellen <i>KpnI</i> und <i>BamHI</i> eingefügte Flag-Epitopsequenz inklusive Startkodon. Dieser Vektor ermöglicht die eukaryontische Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Flag-Epitop.
pSTX-MycHis	: Dieses Plasmid enthält die um die ersten 93 Nukleotide verkürzte kodierende Sequenz der Maus-STX hinter der Ig κ -Signalsequenz im Vektor pSecTag B. Es ermöglicht die rekombinante Expression einer löslichen Form der STX (Deletion der AS 1 bis 31) mit zusätzlichem MycHis-Fusionsanteil am C-Terminus.
pPST-MycHis	: Dieses Plasmid enthält die um die ersten 75 Nukleotide verkürzte kodierende Sequenz der Hamster-PST hinter der Ig κ -Signalsequenz im Vektor pSecTag B. Es ermöglicht die rekombinante Expression einer löslichen Form der PST (Deletion der AS 1 bis 25) mit zusätzlichem MycHis-Fusionsanteil am C-Terminus.

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

Bei der Benennung der hier aufgeführten Plasmide wird folgendes System angewendet:

1. Im Gegensatz zu den Proteinen werden die Plasmide, welche diese Proteine kodieren, durch ein vorangestelltes ‚p‘ im Namen gekennzeichnet.
2. PST steht für die lösliche Form der Hamster-PST (ST8SiaIV), die von pPST-MycHis kodiert wird.

3. STX steht für die lösliche Form der Maus-STX (ST8SiaII), die von pSTX-MycHis kodiert wird.
4. TM-PST steht für die Transmembranform der Hamster-PST, die von pFlagHA-PST (s.u.) kodiert wird.
5. TM-STX steht für die Transmembranform der Maus-STX, die von pFlagHA-STX (s.u.) kodiert wird.
6. Aminosäureaustausche, durch die sich die Mutanten vom Wildtyp unterscheiden, werden nach einem Schrägstrich (/) folgendermaßen aufgeführt: AXB (A bezeichnet die Wildtyp-AS, X die Position der AS im Wildtypprotein und B die in der Mutante anstelle von A anzutreffende AS)

- pPST44 : Dieses von pPST-MycHis abgeleitete Plasmid kodiert eine um die ersten 43 AS verkürzte Form der PST (1. AS: Leucin⁴⁴).
- pPST59 : Dieses von pPST-MycHis abgeleitete Plasmid kodiert eine um die ersten 58 AS verkürzte Form der PST (1. AS: Alanin⁵⁹).
- pPST/C142A, pPST/G146E, pPST/C156A, pPST/C169A, pPST/T189I, pPST/V230A, pPST/V230A/R277G, pPST/R277G, pPST/G281S, pPST/M284I, pPST/C292A, pPST/M333V, pPST/M333L, pPST/E336K, pPST/C356F, pPST/C356A, pPST/C356S, pPST/Q359R :
Diese Plasmide unterscheiden sich vom Ursprungsplasmid pPST-MycHis nur durch die im Plasmidnamen angegebene(n) Mutation(en).
- pPST/C356stop : Dieses Plasmid kodiert eine um die letzten 3 AS (M³⁵⁷-K³⁵⁸-Q³⁵⁹) verkürzte Form der löslichen PST-MycHis.
- pPST/M357Astop : Dieses Plasmid führt zur Expression der löslichen Form der PST-MycHis mit verändertem C-Terminus (M³⁵⁷-K³⁵⁸-Q³⁵⁹ ist ersetzt durch A³⁵⁷).
- pPST/K358stop : Dieses Plasmid kodiert eine um die letzte AS verkürzte Form der PST-MycHis.
- pSTX/G161E, pSTX/T204I, pSTX/R292G, pSTX/G296S, pSTX/M299I, pSTX/M348V, pSTX/E351K, pSTX/C371F : Diese Plasmide unterscheiden sich vom Ursprungsplasmid pSTX-MycHis nur durch die im Plasmidnamen angegebene Mutation.
- pFlagHA : Dieser Vektor unterscheidet sich von pFlagB1 durch eine zusätzliche HA-Epitopsequenz, die mittels der Oligonukleotide HABgl2s und HANot1as zwischen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I eingefügt wurde. Die so entstandene *Bam*HI/*Bgl*II-Schnittstelle ist nun für beide Enzyme nicht mehr zugänglich. Dieser Vektor eignet sich zur Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen FlagHA-Epitop.
- pFlagHA-PST : Dieser Vektor enthält die komplette kodierende Sequenz der Hamster-PST, welche über die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I in den Vektor pFlagHA eingefügt wurde. Er dient damit zur eukaryontischen Expression der membranständigen Form der PST (TM-PST) mit N-terminalem FlagHA-Epitop.
- pTM-PST/G146E, pTM-PST/T189I, pTM-PST/V230A/R277G, pTM-PST/R277G, pTM-PST/G281S, pTM-PST/M284I, pTM-PST/M333V, pTM-PST/E336K, pTM-PST/C356F:
Diese Plasmide unterscheiden sich von pFlagHA-PST nur durch die im Namen aufgeführte(n) Mutation(en).
- pFlagHA-STX : Dieser Vektor enthält die komplette kodierende Sequenz der Maus-STX, welche über die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I in den Vektor pFlagHA eingefügt wurde. Er dient damit zur eukaryontischen Expression der membranständigen Form der STX (TM-STX) mit N-terminalem FlagHA-Epitop.
- pTM-STX/G161E, pTM-STX/T204I, pTM-STX/R292G, pTM-STX/M299I, pTM-STX/G296S, pTM-STX/M348V, pTM-STX/E351K, pTM-STX/C371F:
Diese Plasmide unterscheiden sich von pFlagHA-STX nur durch die im Namen aufgeführte Mutation.

II 1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Amersham Pharmacia Biotech
PNGaseF (N-GlukosidaseF) (1000 U/ μ l)	Roche
Exoneuraminidase aus <i>Vibrio cholerae</i>	Roche
RNaseA aus Rinderpankreas (50 U/mg)	Roche
RNase-freie DNaseI	Promega
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	GibcoBRL/Roche
T3-RNA-Polymerase (10 U/ μ l)	Roche
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma
Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene
SUPERSCRIPT II, RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	GibcoBRL
<i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Bst</i> XI, <i>Eco</i> RI, <i>Esp</i> 3I (<i>Bsm</i> BI), <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I	NEB

Endo NE : Die Endoneuraminidase NE (Endo NE) stammt aus *E. coli* K1-Phagen der Gruppe E [160,161]. Dieses Enzym erkennt α 2,8-verknüpfte Sialinsäuren ab einem Polymerisationsgrad von acht und spaltet ein Oktamer zwischen dem dritten und vierten Rest.

II 1.8 Antikörper

Primärantikörper:

- 735 : Dieser monoklonale Antikörper (mAk) der Subklasse IgG2a erkennt PSA ab einem Polymerisationsgrad von acht [162].
- H28 : Dieser mAk aus der Ratte (IgG2a) erkennt alle Isoformen des murinen NCAMs [163] (Dianova).
- KD11 : Dieser mAk (IgG1) erkennt den C-Terminus der NCAM-Isoformen 140 und 180 und wurde von M. Husmann hergestellt [164].
- 12CA5 : Dieser mAk (IgG2b) erkennt das HA-Epitop "YPYDVPDYASL" (Roche).
- 9E10 : Dieser mAk (IgG1) ist gegen das Myc-Epitop "EQKLISEEDL" gerichtet.
- M5 : Dieser mAk (IgG1) erkennt das Flag-Epitop "MDYKDDDDK" (Sigma).
- 3167 : Dieser mAk (IgG1) erkennt den N-Terminus der Maus-STX und wurde von M. Mühlenhoff hergestellt und charakterisiert.
- 3169 : Dieser mAk (IgG1) erkennt den zentralen Bereich der Maus-STX und wurde von M. Mühlenhoff hergestellt und charakterisiert.
- 3187 : Dieser mAk (IgG1) erkennt den C-Terminus der Maus-STX und wurde von M. Mühlenhoff hergestellt und charakterisiert.
- Das polyklonale Kaninchen-Serum gegen die katalytische Untereinheit der α -MannosidaseII wurde von K. Moremen (University of Georgia, Athens, GA) zur Verfügung gestellt [165].
- Das polyklonale Kaninchen-Serum gegen den zytoplasmatischen Teil des Calnexins wurde von B. Sodeik (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt [166].
- Anti-Digoxigenin-Ig-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Fab-Fragmente) [750 U/ml] (Roche)

Sekundärantikörper:

anti-Maus-Ig-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Dianova
anti-Maus-Ig-DTAF-Konjugat	Dianova
anti-Kaninchen-Ig-TRITC-Konjugat	Dianova

II 1.9 Standardpuffer und -lösungen

AP-Puffer	: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,4
BCIP-Stammlösung	: 25 mg/ml BCIP in 100% DMF
GEBS(2x)	: 20% Glycerol, 50 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sarcosyl
GEBS(5x)	: 50% Glycerol, 125 mM EDTA, 0,125% Bromphenolblau, 1,25% Sarcosyl
Laemmli-Puffer(2x)	: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) Glycerin, 5% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-ME, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Laemmli-Puffer(5x)	: 600 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-ME, 0,4% (w/v) Bromphenolblau
NBT-Stammlösung	: 50 mg/ml NBT in 70% DMF
PBS	: 10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl
PBS für Zellkultur	: 10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7,4
PBS/EDTA	: 2 mM EDTA in PBS für Zellkultur
RNA-Auftragspuffer	: 50% Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 10 mM EDTA, 20% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 50 µg/ml Ethidiumbromid
SSC(20x)	: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
TBE	: 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,0
TBS	: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TE	: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

II 1.10 Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker:

‚1kb-Ladder‘ [1 µg/µl] [kb]: 0,075; 0,134; 0,154; 0,201; 0,22; 0,298; 0,344; 0,396; 0,506; 0,517; 1,018; 1,636; 2,054; 3,054; 4,072; 5,09; 6,108; 7,126; 8,144; 9,162; 10,18; 11,198; 12,216	GibcoBRL
‚100 bp-Ladder‘ [1 µg/µl] [bp]: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072	GibcoBRL
‚λ-DNA/HindIII-Fragments‘ [0,5 µg/µl] [kb (ng DNA in 10 µl Marker)]: 0,135 (5); 0,56 (11); 2,03 (41); 2,23 (47); 4,63 (89); 6,68 (137); 9,41 (194); 23,13 (476)	GibcoBRL

RNA-Marker:

‚0,24 - 9,5 kb RNA Ladder‘ [1 µg/µl] [kb]: 0,24; 1,35; 2,37; 4,4; 7,46; 9,49	GibcoBRL
---	----------

Protein-Marker:

‚SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range‘ [kDa]: 14,4; 21,5; 31; 45; 66,2; 97,4	BioRad
‚SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range‘ [kDa]: 45; 66,2; 97,4; 116; 200	BioRad

,[¹⁴C]-Methylated Proteins' [5 µCi/ml]
[kDa]: 14,3; 30; 46; 66; 97,4; 100; 220

Amersham Pharmacia Biotech

II 1.11 Kits

,DIG RNA Labeling Kit'	Roche
,High Pure Plasmid Isolation Kit'	Roche
,Oligotex mRNA Kit'	Qiagen
,Rapid DNA Ligation Kit'	Roche
,QIAprep Spin Plasmid Kit'	Qiagen
,QIAquick Gel Extraction Kit'	Qiagen
,QIAquick PCR Purification Kit'	Qiagen
,GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit'	Amersham Pharmacia Biotech
,Plasmid Kit (Midi/Maxi)'	Qiagen
,T7-Sequencing Kit'	Amersham Pharmacia Biotech
,Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit'	Amersham Pharmacia Biotech
,ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit'	PE Biosystems
,pGEM-T Vector Systems'	Promega

II 1.12 Geräte

Blotkammer Fast-Blot B33	Biometra
Brutschrank	Heraeus
373 DNA Sequencer <i>Stretch</i>	Applied Biosystems
ELISA-Reader Titertek Multiskan MCC/340	Flow Laboratories
Easy Enhanced Analysis System (Easy RH-3, Videokamera 429K)	Herolab
Filtron	GelmanSciences
FPLC LCC 500/P-500	Amersham Pharmacia Biotech
Gelkammer Agarosegele	Hofer
Geltrockner: Modell 583	BioRad
SGD 4050	Savant
GeneAmp PCR System 2400	PE Biosystems
Heizblock Modell 583	Grant
Hybridisierungsofen	Heraeus
MiniGel-Elektrophoresekammer	Biometra
Peristaltic Pump P-1	Amersham Pharmacia Biotech
Phosphoimager Bas 1000	Fujix
Phosphoimager Plate	Fuji
Photometer, Ultraspec III	Amersham Pharmacia Biotech
Sequencing Gel Electrophoresis System Model S2	GibcoBRL
SpeedVac-Concentrator	Savant
UV-Stratalinker	Stratagene
Zentrifugen : Biofuge 13	Heraeus, Sepatech
Kühlzentrifuge Modell J2-21	Beckmann
Minifuge T	Heraeus, Sepatech
Ultrazentrifuge	Beckmann

II 1.13 Chemikalien

α -[³⁵ S]-dATP (400 Mbq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech
2-Mercaptoethanol	Merck
ABDF	Molecular Probes
Aceton	Riedel de Haën
Acrylamid 40% (37,5:1)	Applichem
Acrylamid 40% (29:1)	Roth
Acrylamid 40% (19:1)	GibcoBRL
Agarose, ultra PURE	GibcoBRL
Ampicillin (Binotal)	Bayer
APS	BioRad
BCA-Proteinreagenz	Pierce
Blockingreagenz	Roche
BCIP	Fluka/Roth
Borat, Natriumsalz	Merck
BSA (Fraktion V)	Applichem
BSA-Proteinstandard	Pierce
Calciumchlorid	Merck
CSPD	Roche
Cytidin 5'-monophospho[¹⁴ C]Sialinsäure (10,5 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech
DEPC	Sigma
Dimethylpimelimidat, Dihydrochlorid	Sigma
DMF	Sigma
DMSO	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
dNTPs (je 100 mM ATP, CTP, GTP, TTP in H ₂ O), ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech
Dodecylsulfat, Natriumsalz	Merck
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen
Essigsäure (100 %)	Merck
Ethanol (absolut)	Baker
Ethanolamin	Aldrich
Ethidiumbromid	Roche
EDTA, Dinatriumsalz	Merck
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Merck
Glutardialdehyd (25%ige Lösung in Wasser)	Merck
Glycerol (wasserfrei)	Merck
Glycin	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haën
Jodactetamid	Fluka
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Levamisol, Hydrochlorid	Sigma
LipofectAMINE Transfektionsreagenz	GibcoBRL
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck

Manganchlorid	Merck
Methanol	Baker
Moviol	Calbiochem
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcacodylat (,Dimethylarsinic acid')	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel de Haën
Natriumthiosulfat	Sigma
NBT	Fluka
NP-40	Roche
Paraformaldehyd	Baker
PEG-1500	Sigma
Phenol/Chloroform/Amylalkohol (25:24:1)	Roth
PMSF	Sigma
Ponceau S, Natriumsalz	Sigma
ProteinG-Sepharose	Roche
Repel-Silan	Amersham Pharmacia Biotech
Roti-Blue	Roth
Salzsäure, konz.	Riedel de Haën
SuperFect Transfektionsreagenz	Qiagen
TEMED	Serva
Trasylol (Aprotinin) (1,4 mg/ml)	Bayer
Trichloressigsäure	Merck
TCEP	Molecular Probes
Tris	Serva
Triton X-100	Fluka
Trypanblau (0,4 %)	Sigma
Tween 20	Fluka
X-Gal	Roth

II 1.14 Sonstige Materialien

Centricon-30-Mikrokonzentratoren	Amicon
Celluloseacetatfilter (0,8 µm)	Sartorius
Celluloseacetat-Filtrationseinheit (0,22 µm, steril)	Corning
Chromatographiepapier, 3 MM	Whatman
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Jürgens
Diaflo Ultrafilter XM-50	Amicon
Einmal-Injektionskanülen (Ø 0,8 mm)	Braun
Filterpapier 3 MM	Whatman
FugiSep Maxi (30000 kDa)	Intersep
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech
Kryoröhrchen	Corning
Leersäulen	Amersham Pharmacia Biotech

Mikrotiterplatten, PS-Mikroplatten 96 K	Greiner
Millex GV Filter (0,22 µm steril)	Milipore
Nitrocellulose (0,1 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell
Polypropylenröhrchen	Greiner
Polystyrolröhrchen	Greiner
Qiabranen Nylonmembran (positiv geladen)	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml)	Greiner
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner
Universalindikatorpapier, pH 0 - 14	Macherey-Nagel
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner

II 2 Methoden

II 2.1 Molekularbiologische Methoden

II 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

II 2.1.1.1 Schnelltest zur Überprüfung der Plasmidgröße

100 µl Bakterienkultur wurden mit 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) und 10 µl Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Glycerol) versetzt, kräftig durchmischt (Vortex, 10 s) und zentrifugiert (14500xg, 3 min, RT). 30 µl des Überstandes wurden im Agarosegel aufgetrennt (II 2.1.3) und die Größe der Plasmid-DNA überprüft.

II 2.1.1.2 Analytische Plasmidpräparation

1,5 bis 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 upm vermehrt. Die Bakterien wurden bei 7000xg sedimentiert und das Pellet in 100 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl Puffer 2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) und vorsichtiges Durchmischen wurden die Bakterien lysiert (5 min, RT). Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 150 µl gekühltem Puffer 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) und 5 min Inkubation auf Eis gefällt und pelletiert (14500xg, 10 min, RT). Der Überstand wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und die DNA für mindestens 30 min bei -70°C präzipitiert. Nach der Sedimentation der DNA (14500xg, 15 min, 4°C) wurde das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung der DNA im Vakuum wurde diese in 20 µl TE oder H₂O bidest. aufgenommen.

II 2.1.1.3 Mini-Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA im Maßstab bis zu 10 µg wurde mit dem ‚High Pure Plasmid Isolation Kit‘ nach der Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien einer 5 ml Übernachtskultur sedimentiert (14500xg, 1 min, RT) und das Pellet in 250 µl ‚Suspension Buffer‘ resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl ‚Lysis Buffer‘ wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei RT lysiert. Danach erfolgte die Zugabe von 350 µl ‚Binding Buffer‘ und nach Zentrifugation (14500xg, 10 min, 4°C) der Auftrag des Überstandes auf die Säule. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14500xg, 1 min, RT) wurde die an die Säule gebundene DNA mit 700 µl ‚Wash Buffer‘ gewaschen und anschließend mit 50 µl ‚Elution Buffer‘ eluiert.

II 2.1.1.4 Midi-Plasmidpräparation

Diese Präparation eignet sich für die Aufreinigung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA. Sie wurde mit dem ‚Qiagen Plasmid Kit‘ nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 100 ml LB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin mit einigen Kolonien oder mit 50 µl einer Vorkultur angeimpft und die Bakterien über Nacht bei 200 upm und 37°C vermehrt. Die Bakterien wurden sedimentiert (6000xg, 15 min, 4°C) und das Pellet in 4 ml ‚Buffer P1‘ resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml ‚Buffer P2‘ wurden die Lösungen gut durchmischt und 5 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml kaltem ‚Buffer P3‘ gestoppt und nach weiteren 15 min auf Eis wurden die Zelltrümmer und Proteine durch Zentrifugation (20000xg, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und gegebenenfalls erneut zentrifugiert. Die Säule (QIAGEN-Tip 100) wurde durch Zugabe von 4 ml ‚Buffer QBT‘ equilibriert und nach dem Auftrag des Überstandes zweimal mit 10 ml ‚Buffer QC‘ gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 5 ml ‚Buffer QF‘. Anschließend wurde die DNA mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und pelletiert (20000xg, 30 min, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, im Vakuumofen getrocknet und in 250 µl TE oder H₂O bidest. aufgenommen.

II 2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen (DNA und RNA) wurde photometrisch durch Aufnahme der UV-Absorption bei 260, 280 und 320 nm in einer Quarzglaszentrifuge bestimmt. Die Berechnung der Konzentration basiert auf folgenden Richtwerten: doppelsträngige DNA mit 50 µg/ml und einzelsträngige DNA bzw. RNA mit 40 µg/ml weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm Extinktionswerte von 1,0 auf. Die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} , der bei optimaler Reinheit 2,0 beträgt, bestimmt. Sehr geringe DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel durch Vergleich mit λ -HindIII-Marker abgeschätzt.

II 2.1.3 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben wurden mit GEBS versetzt und in horizontalen Gelen mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,5 und 2,0% aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TBE als Laufpuffer. Die Gele wurden nach der Auftrennung in Ethidiumbromid-Lösung (50 µg/ml) angefärbt, und die DNA anschließend durch Aktivierung des interkalierten Farbstoffes unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde das ‚Easy Enhanced Analysis System‘ der Firma Herolab benutzt.

II 2.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese nach der Auftrennung im Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt und die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Extraktion aus der Gelmatrix wurde zu Beginn dieser Arbeit der ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ und später der ‚GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit‘ verwendet. Die Gelstücke wurden je nach Gewicht mit dem entsprechenden Volumen an ‚Buffer QG‘ bzw. ‚Capture Buffer‘ versetzt. Nachdem sich die Gelstücke durch Inkubation bei 50 bis 60°C vollständig aufgelöst hatten, wurde bei Verwendung des Qiagen-Kits ein Volumen Isopropanol zugegeben. Die DNA-Lösungen wurden auf die jeweiligen Säulen aufgetragen und zentrifugiert (14500xg, 1 min, RT). Das Filtrat wurde verworfen und die Säulen mit 750 µl ‚Buffer PE‘ bzw. 500 µl ‚Wash Buffer‘ durch erneute Zentrifugation gewaschen. Dieses Filtrat wurde ebenfalls verworfen und die Qiagen-Säulen eine weitere Minute zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl H₂O bidest. oder TE-Puffer (14500xg, 1 min, RT).

II 2.1.5 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um DNA von Proteinkontaminationen zu reinigen, wurde der auf 100 µl mit H₂O bidest. aufgefüllte Ansatz mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Amylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt, gründlich gemischt und zur Phasenrennung zentrifugiert (14500xg, 5 min, RT). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA daraus präzipitiert (II 2.1.6).

II 2.1.6 Präzipitation von DNA

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung (3 M Natriumacetat pH 5,2) und dem dreifachen Volumen an kaltem (-20°C) 96%igem Ethanol versetzt. Die DNA wurde dann über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -70°C präzipitiert. Nach der Sedimentation der DNA (145000xg, 30 min, 4°C) wurde das Pellet in kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert (14500xg, 10 min, 4°C). Das DNA-Pellet wurde im Vakuum getrocknet und in H₂O bidest. oder TE aufgenommen.

II 2.1.7 Restriktionsspaltung von DNA

Plasmid-DNA und PCR-Fragmente wurden mit den jeweiligen Enzymen im entsprechenden Puffer (NEB 1 bis 4) nach Herstellerangaben verdaut. Die Inkubationszeiten lagen dabei je nach Enzym zwischen 1 h, z.B. für *EcoRI*, und 24 h. Bei analytischen Spaltungen von Plasmid-DNA wurden 1 bis 4 µl DNA-Lösung mit 2,5 bis 5 U des entsprechenden Enzyms versetzt. Bei präparativen Restriktionsspaltungen wurden 1 bis 5 µg DNA und 5 bis 10 U Enzym verwendet, wobei das Volumen der eingesetzten Enzymlösung maximal ein Zehntel des Gesamtreaktionsvolumens betrug. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte, soweit möglich, bei 85°C für 15 min. Zur Überprüfung der Verdau wurden Aliquots der Restriktionsansätze mit GEBS versetzt und im Agarosegel analysiert (II 2.1.3). Bei präparativen Spaltungen wurde der Gesamtansatz mit GEBS versetzt, im Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente anschließend aus dem Gel extrahiert (II 2.1.4).

II 2.1.8 Dephosphorylierung

Um inter- und intramolekulare Reaktionen von linearisierten Vektoren bei Ligationen zu vermeiden, wurden diese zuvor mit Alkalischer Phosphatase versetzt. Dazu wurden 2 µg linearisierter Vektor mit 1 U Alkalischer Phosphatase in Dephosphorylierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,1 mM EDTA) und einem Gesamtvolumen von 20 µl für 60 min bei 37°C inkubiert. Überdies wurden Dephosphorylierung und Restriktionsspaltung auch gleichzeitig durchgeführt. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 U Alkalische Phosphatase zugesetzt.

II 2.1.9 Ligation

20 fmol linearisierter und gegebenenfalls dephosphorylierter Vektor wurden mit 60 bis 100 fmol des zu ligierenden Fragmentes in 10 bis 20 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, 5 µg/ml BSA) mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C ligiert. In einigen Fällen wurden Ligationen mit dem ‚Rapid DNA Ligation Kit‘ durchgeführt. Nach den Angaben des Herstellers wurden der Vektor und das zu ligierende Fragment in einem molaren Verhältnis zwischen 1+1 und 1+5 bei einer DNA-Gesamtmenge von ca. 200 ng in 10 µl ‚Dilution Buffer (1x)‘ zusammengegeben. Nach Zugabe von 10 µl ‚T4-DNA-Ligation-Buffer‘ und 1 µl T4-DNA-Ligase wurde 5 bis 30 min bei RT ligiert. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten mit 3'A-Überhängen wurde das ‚pGEM-T Vector-System‘ benutzt. Der Ligationsansatz bestand dabei aus 0,7 µl Vektor (50 ng/µl), 1 µl T4-DNA-Ligase und der zu ligierenden DNA in ‚2x Rapid Ligation Buffer‘. Die Ligation wurde entweder bei RT für 1 h oder über Nacht bei 16°C durchgeführt, bevor der Ansatz in *E. coli* transformiert wurde.

II 2.1.10 Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotid-Adapttern

Jeweils 10 µl der zu hybridisierenden, am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide (100 pmol/µl in T4-DNA-Ligase-Puffer) wurden zusammengegeben und 2 min auf 95°C erhitzt. Es folgte eine Abkühlungsphase auf 50°C, die ca. 20 min dauerte. Nach 5minütiger Inkubation bei 50°C begann die weitere Abkühlung auf RT. Zur Ligation wurden 1 bis 2 µl einer 1:1000-Verdünnung des Hybridisierungsansatzes (entsprechend 50 bis 100 fmol Oligonukleotid-Adapter) und 5 bis 10 fmol geschnittener Vektor eingesetzt. Die Reaktion wurde in T4-DNA-Ligase-Puffer und mit 1 U T4-DNA-Ligase durchgeführt.

II 2.1.11 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*

100 ml LB-Medium wurden mit 500 µl einer Vorkultur von *E. coli* DH5α angeimpft und die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C vermehrt (200 upm). Die Bakterienkultur wurde 5 min auf Eis inkubiert, pelletiert (4000xg, 10 min, 4°C) und in 40 ml eiskalter MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000xg, 10 min, 4°C) wurden die Bakterien in 40 ml CaCl₂-Lösung (50 mM) aufgenommen, wie zuvor beschrieben zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 4 ml CaCl₂-Lösung (50 mM) erneut aufgenommen. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurden 400 µl Glycerin zugesetzt, die Suspension à 200 µl aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

II 2.1.12 Transformation

200 µl CaCl₂-kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 ng Plasmid-DNA oder dem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 90 s auf 42°C erwärmt und anschließend weitere 20 min gekühlt (0°C). Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden direkt auf LB-Agar-Platten, denen 100 mg/ml Ampicillin zugesetzt worden war, ausgestrichen. Der restliche Ansatz wurde pelletiert und die Bakterien in 100 µl LB-Medium aufgenommen und ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

II 2.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich aus geringsten DNA-Mengen definierte Abschnitte *in vitro* vervielfältigen. Die DNA-Polymerasen benötigen zum Synthesestart kurze doppelsträngige DNA-Bereiche, die durch Hybridisierung mit synthetischen sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) gebildet werden (komplette Liste der verwendeten Primer unter II 1.5). Für jede Amplifikation wird somit ein Primer, der an den kodierenden Strang bindet („antisense“-Primer), und ein Primer, der an den nicht-kodierenden Strang bindet („sense“-Primer), benötigt. Ein Verdopplungszyklus beinhaltet die folgenden Phasen: Hitzedenaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und Synthese der Tochterstränge (Elongation). Verwendet wurde die hitzestabile *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase. Ein Standardreaktionsansatz (100 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 bis 50 ng	DNA-Matrize
100 pmol	Primer 1 („sense“)
100 pmol	Primer 2 („antisense“)
10 µl	10x PCR-Puffer (inkl. MgCl ₂)
je 200 nmol	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
2,5 / 5 U	<i>Taq</i> - / <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
ad 100 µl	H ₂ O bidest.

In einer PCR-Maschine (GeneAmp PCR System 2400, PE Biosystems) wurden 25 bis 40 Reaktionszyklen durchgeführt. Das Standardtemperaturprofil sah folgendermaßen aus:

- Initiale Denaturierung 2 min 94°C
- 25 - 40 Zyklen:
 - Denaturierung 30 s 94°C
 - Hybridisierung 45 s 40 - 68°C
 - Elongation 60 s/kb 72°C (*Taq*-DNA-Polymerase)
 - oder 120 s/kb 72°C (*Pfu*-DNA-Polymerase)
- Terminale Elongation 10 min 72°C

Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, dass sie unter der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer lag. T_m wurde anhand folgender Näherungsformel bestimmt:

$$T_m [^\circ\text{C}] = (\text{Anzahl der AT-bp}) \times 2 + (\text{Anzahl der GC-bp}) \times 4$$

II 2.1.14 Mutagenese mittels PCR

Die zielgerichtete Mutagenese von einzelnen oder mehreren Aminosäuren einer bekannten Sequenz wurde im Fusions-PCR-Verfahren durchgeführt (Verfahren auch beschrieben in [167]). Dazu wurden pro Mutation zwei Mutageneseprimer benötigt, von denen einer aus der veränderten Nukleotidsequenz des kodierenden Strangs (5'→3') und der andere aus der komplementären Sequenz bestand. In Bezug auf die Position der zu mutierenden Sequenz haben beide Primer jeweils einen 3'-Überhang. Im ersten Schritt wurden nun zwei Mutagenese-PCRs durchgeführt; die eine mit dem Mutageneseprimer des kodierenden Stranges und einem ‚antisense'-Primer, der an die Wildtypsequenz bindet, die andere mit dem Mutageneseprimer des nicht-kodierenden Stranges und einem Wildtyp-‚sense'-Primer. Die Mutagenese-PCRs wurden mit *Pfu*-DNA-Polymerase, die eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-DNA-Polymerase aufweist, und mit der Wildtypsequenz als Matrizen-DNA durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt (II 2.1.3) und anschließend daraus aufgereinigt (II 2.1.4). In der Fusions-PCR wurden diese Fragmente dann anhand ihres kurzen komplementären Bereiches, der die gewünschte Mutation enthält, hybridisiert und unter Zusatz von *Pfu*-DNA-Polymerase und den zuvor verwendeten Wildtyp-Primern amplifiziert. Das so generierte DNA-Fragment, welches sich von der Wildtypsequenz nur durch die eingefügte Mutation unterscheidet, wurde im Agarosegel aufgetrennt, extrahiert und nach Restriktionsspaltung (II 2.1.7) in einen geeigneten Vektor ligiert (II 2.1.9). Nach der Transformation in *E. coli* (II 2.1.12) wurden mehrere Klone analysiert und der eingefügte Bereich des Plasmids zur Kontrolle sequenziert (II 2.1.15).

II 2.1.15 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

II 2.1.15.1 Radioaktive Sequenzierung

Die radioaktive Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach der Dideoxymethode [168] unter Verwendung des ‚T7-Sequencing Kits' bzw. des ‚Thermo Sequenase cycle sequencing Kits'. Pro Reaktion wurden 1,5 bis 2 µg DNA aus Mini- bzw. Midi-Plasmidpräparationen in maximal 8 µl Volumen eingesetzt. Zur Denaturierung wurden 2 µl 2 M NaOH-Lösung zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6, 7 µl H₂O bidest. und 60 µl absolutem Ethanol wurde die DNA 15 min bei -70°C gefällt und sedimentiert (14500xg, 10 min, 4°C). Die DNA wurde in 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (14500xg, 10 min, 4°C) und im Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl H₂O bidest. gelöst, 2 µl ‚Annealing Buffer' bzw. ‚Reaction Buffer' und 1 µl Primer (1,2 µM bzw. 0,5 µM) hinzugegeben und bei 37°C

für 20 min bzw. bei 70°C für 2 min hybridisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf RT abgekühlt. Zur Sequenzierungsreaktion wurde jedem Hybridisierungsansatz eine Mischung aus 3 µl 'Labelling-Mix' bzw. 'Cycle Mix', 0,25 bzw. 0,5 µl α -[³⁵S]-dATP (2,5 bzw. 5 µCi) und 2 µl T7-Polymerase bzw. Thermo-sequenase zugegeben und anschließend für 5 min bei RT bzw. 55°C inkubiert. Die Terminationsreaktionen fanden für 5 min bei 37°C mit 2,5 µl vorgewärmten ddNTPs bzw. für 5 bis 10 min bei 55 bis 70°C mit 4 µl ddNTPs statt und wurden durch Zugabe von 5 bzw. 4 µl 'Stop Solution' beendet. Vor dem Auftrag auf ein Sequenzgel wurden die Proben 5 min bei 95°C bzw. 10 min bei 70°C denaturiert. Die denaturierten Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden in 8%igen Polyacrylamidgelen (40% Acrylamid, 2% N,N'-Methylen-diacrylamid, 7 M Harnstoff) der Größe 0,4 mm x 31 cm x 38,5 cm in einer Sequenzgel-Kammer mit TBE als Lauf- und Gelpuffer aufgetrennt. Nach 60 min Vorlauf (75 Watt) wurden die Proben aufgetragen (3,5 µl je Spur) und bei einer konstanten Leistung von 70 Watt aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend 2 h unter Vakuum bei 80°C getrocknet und über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert.

II 2.1.15.2 Automatische Sequenzierung

Im letzten Jahr dieser Arbeit wurde die radioaktive Sequenzierung mit [³⁵S]-markiertem dATP durch die automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden ersetzt. Dazu wurde der 'ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' eingesetzt. Pro Reaktion wurden ca. 500 ng doppelsträngige DNA aus einer Mini- oder Midi-Plasmidpräparation mit 5 pmol Primer und 4 µl 'Terminator Ready Reaction Mix' in 10 µl Gesamtvolumen für die Sequenzreaktion in der PCR-Maschine zusammengegeben. Die PCR und die weitere Behandlung der Proben wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die markierten DNA-Fragmente durch Zugabe von 10 µl H₂O bidest., 50 µl 96%igem Ethanol und 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 für 30 min bei -70°C gefällt, sedimentiert (14500xg, 20 min, 4°C), mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut pelletiert und anschließend in der SpeedVac getrocknet. Vor dem Auftrag auf das Gel (8% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 13,5 M Harnstoff) wurden die DNA-Fragmente in 4 µl 'Loading Buffer' aufgenommen und für 2 min bei 95°C denaturiert. Zur Gelelektrophorese, Datenerfassung und Auswertung wurde der 373 DNA Sequencer *Stretch* benutzt.

II 2.1.16 Isolierung von gesamt-RNA

Bis zu 2×10^7 Zellen wurden nach einmaligem Waschen in PBS in 7 ml GSCN-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumacetat pH 5,2, 1% β -Mercaptoethanol) lysiert und durch Ultraturrax-Behandlung (Ultraturrax Modell T25, 30 sec, 24000 upm) oder durch wiederholtes Aufziehen durch eine Injektionskanüle mit 0,8 mm Durchmesser homogenisiert. Das Homogenat wurde über einen CsCl-Kissen (5 ml 96% CsCl in 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA) geschichtet und 18 h bei 35000 upm (18°C, SW40-Rotor, Beckmann) ultrazentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in 250 µl TE aufgenommen und nach der Bestimmung der RNA-Konzentration zur Isolierung von mRNA eingesetzt.

II 2.1.17 Isolierung von mRNA (poly(A⁺)-RNA)

Polyadenylierte RNA oder mRNA wurde mit Hilfe des 'Oligotex mRNA Kits' affinitätschromatographisch über oligo(dT)-beschichtete Polystyrene-Latex-Partikel aus gesamt-RNA aufgereinigt. Dazu wurde bis zu 1 mg gesamt-RNA mit den entsprechenden Mengen an 'Buffer OBB' und Oligotex-Suspension versetzt, für 3 min bei 70°C und für 10 min bei RT inkubiert. Das Oligotex-mRNA-Pellet wurde nach Resuspendierung in 'Buffer OW2' auf die Säulen übertragen. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die mRNA mit 70°C warmem 'Buffer OEB' von der Säule eluiert. Nun folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt, bei dem die zuvor in 200 µl eluierte mRNA erneut mit Oligotex-Suspension isoliert wurde. Das Elutionsvolumen betrug in der zweiten Aufreinigung 22 µl, von denen 2 µl zur photometrischen Konzentrationsbestimmung verwendet wurden. Doppelt aufgereinigte mRNA wird im folgenden als poly(A⁺)-RNA bezeichnet.

II 2.1.18 RT-PCR

II 2.1.18.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit der reversen Transkriptase SUPERSCRIPT II nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 0,5 bis 2 µg poly(A⁺)-RNA und 1 bis 10 pmol des PST-spezifischen RT-Primers ME52 oder ME54 (siehe II 1.5, Tab. 2 und Abb. 6) in 12 µl Gesamtvolumen für 10 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert (14500xg, 1 min, 4°C). Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne mRNA und eine Positivkontrolle mit Wildtyp-mRNA (Lec2 oder CHO-K1) mitgeführt. Nach Zugabe von 4 µl ‚First Strand Buffer‘ (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dNTP) wurde gemischt, die Probe kurz zentrifugiert (14500xg, 1 min, 4°C) und der Reaktionsansatz auf 42°C vorgewärmt. Nach 2 min wurde 1 µl Superscript II (200 U/µl) hinzugegeben und 50 weitere Minuten bei 42°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C (15 min) beendet wurde. Nach der Hitzeinaktivierung wurde der cDNA-Erststrang durch Anwendung des ‚QIAquick PCR Purification Kits‘ aufgereinigt. Dazu wurde der cDNA-Synthese-Ansatz mit 5 Volumina ‚Buffer PB‘ versetzt und in eine Säule überführt. Nach Zentrifugation (14500xg, 1 min, RT) wurde die Säule mit 750 µl ‚Buffer PE‘ gewaschen (14500xg, 1 min, RT), erneut zentrifugiert und die DNA in 30 µl ‚Buffer EB‘ eluiert.

II 2.1.18.2 PCR

Der erste Schritt der RT-PCR, die reverse Transkription oder cDNA-Synthese, wurde wie zuvor beschrieben (II 2.1.18.1) durchgeführt. Der so gewonnene cDNA-Erststrang wurde durch PCR (siehe dazu auch II 2.1.13) in DNA-Doppelstrang umgewandelt und vervielfältigt. Dabei wurden die in Tab. 2 aufgeführten Primerkombinationen, welche alle zur Amplifikation der gesamten kodierenden Sequenz der PST führen, verwendet (zur Sequenzinformation siehe II 1.5). Die Lage der Primer in der PST-cDNA ist in Abb. 6 dargestellt. Die PCR wurde mit 2 bis 6 µl des gereinigten cDNA-Erststrangs als Matrize und mit *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Kontrollen der cDNA-Synthese, eine neue Negativkontrolle, die H₂O statt des cDNA-Ansatzes enthielt, und eine Positivkontrolle, die 1 µl des Vektors pME7 in 1:100000-Verdünnung beinhaltete, wurden parallel mitgeführt. Die Zyklusparameter der PCR waren folgendermaßen:

- Initiale Denaturierung 5 min 94°C
- 40 Zyklen:
 - Denaturierung 45 s 94°C
 - Hybridisierung 45 s 62°C
 - Elongation 80 s 72°C
- Terminale Elongation 10 min 72°C

Im Anschluß an die PCR wurde jeder Reaktionsansatz mit 10 µl GEBS(5x) versetzt und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (II 2.1.3). Nach Inkubation des Gels in Ethidiumbromid und Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurden entsprechende Gelstücke in den Bereichen, wo das PCR-Amplifikat erwartet wurde, ausgeschnitten und die enthaltenen DNA-Fragmente daraus extrahiert (II 2.1.4). Nach einer zweiten Amplifikationsrunde unter gleichen PCR-Bedingungen, in die ebenfalls die bisherigen Negativkontrollen, die Positivkontrolle der cDNA-Synthese und eine neue Positiv- sowie Negativkontrolle (s. o.) eingesetzt wurden, erfolgte die Auftrennung des Reaktionsansatzes im Agarosegel. Vor einer weiteren Verarbeitung der Proben wurden die Kontrollen auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Anschließend wurden die cDNA-Banden ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert. Durch Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase in beiden PCRs und die dadurch entstandenen 3'A-Überhänge wurde die direkte Ligation der aufgereinigten PCR-Fragmente in den pGEM-T Vektor ermöglicht (II 2.1.9).

Primer- kombination	RT- Reaktion	1. PCR		2. PCR	
		5'-Primer	3'-Primer	5'-Primer	3'-Primer
1	ME54	ME21	ME22	ME21	ME22
2	ME54	ME53	ME22	ME21	ME22
3	ME54	AH30	MM17	ME53	AH29
4	ME52	ME21	ME22	ME21	ME22
5	ME52	AH30	AH29	AH30	AH29
6	ME52	AH30	AH29	ME53	MM17
7	ME52	ME51	ME54	ME53	MW7
8	ME52	ME51	ME54	ME53	ME54
9	ME52	ME51	ME54	ME53	MW7
10	ME52	ME53	MW7	ME53	MW7

Tab. 2: Primerkombinationen, die zur reversen Transkription und anschließenden Amplifikation der PST-cDNAs verwendet wurden.

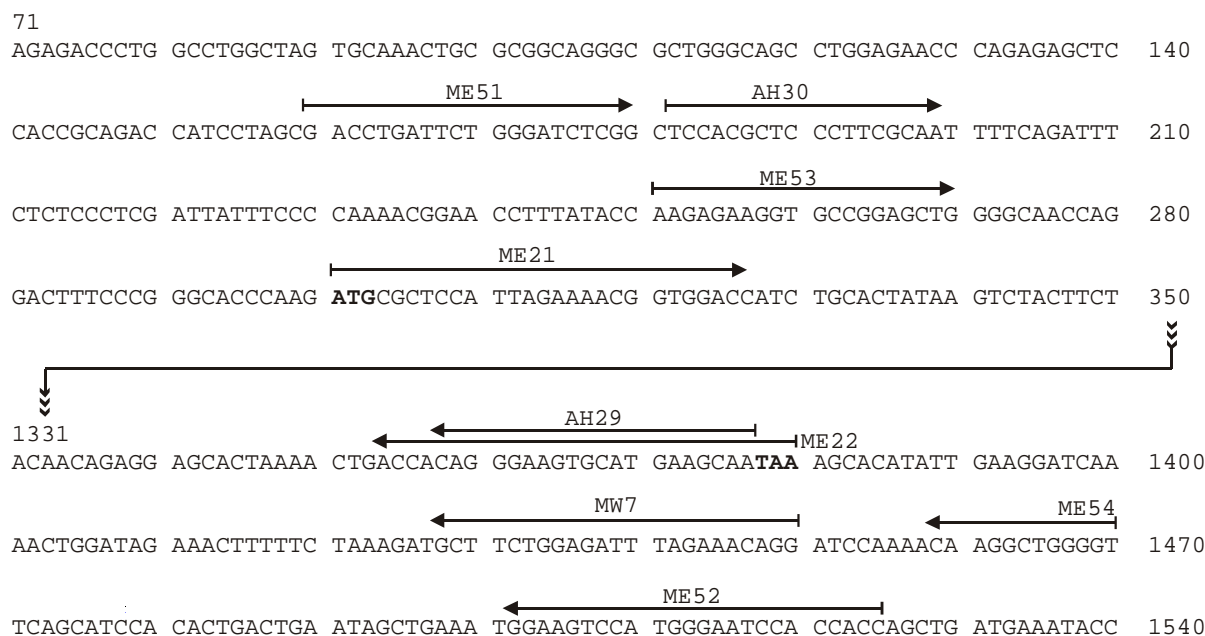


Abb. 6: Schematische Darstellung der Zielsequenz von RT-PCR-Primern. Es wurden verschiedene Kombinationen eingesetzt, die alle zur Amplifikation des gesamten kodierenden Bereiches der PST führen. Aufgeführt ist nur der Bereich der PST-cDNA, in dem die Primer hybridisieren. Die gesamte cDNA-Sequenz ist im Anhang unter VI 1 dargestellt.

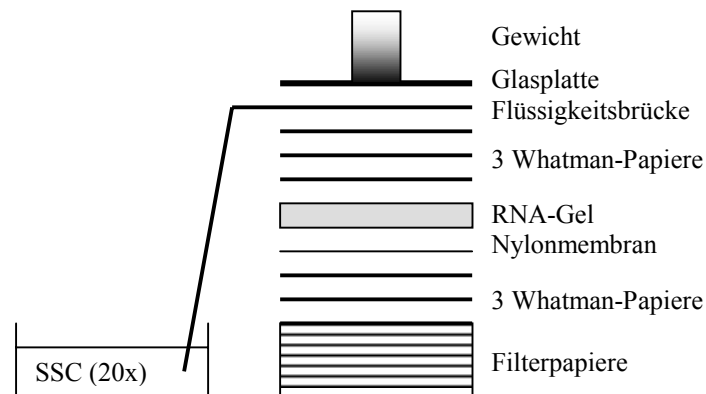
II 2.1.19 Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

RNA wurde in 1%igen Agarosegelen mit 0,5 M Formaldehyd aufgetrennt. Der Gel- und Laufpuffer bestand aus 20 mM MOPS pH 7,0, 10 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA. Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit einem Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 3,5 V/cm.

II 2.1.20 Northern Blot

4 µg der poly(A⁺)-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (II 2.1.19) und das Gel anschließend zweimal für 15 min in SSC(20x) äquiliibriert. Der Übertrag der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran, die zuvor erst in DEPC-behandeltem H₂O und dann in SSC(20x) geschwenkt worden war, erfolgte über Nacht bei RT durch Kapillartransfer mit SSC(20x) als Transferpuffer.

Die Blotapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut:



Nach Abschluss des Transfers wurde die Nylonmembran getrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung kovalent darauf fixiert (UV-Stratalinker).

II 2.1.21 Methylenblaufärbung

Der RNA-Molekulargewichtsmarker wurde durch Methylenblaufärbung auf der Nylonmembran dargestellt. Die Markerspür wurde dazu abgetrennt, für 5 min bei RT in Methylenblau-Lösung (0,5% Methylenblau, 0,3 M Natriumacetat pH 5,2) gefärbt und anschließend mit H₂O entfärbt.

II 2.1.22 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Das Digoxigenin-System stellt eine Alternative zur radioaktiven Markierung von DNA- und RNA-Sonden dar. Die Sonden werden über den enzymatischen Einbau von Uridin-Nukleotiden, die kovalent an Digoxigenin (Dig) gekoppelt sind, markiert und nach der Hybridisierung mit Hilfe eines hochaffinen anti-Digoxigenin-Antikörpers, der an Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, detektiert. Zur Herstellung einer Dig-markierten PST-, antisense'-Sonde mit dem 'DIG-RNA Labeling Kit' wurden ca. 5 µg des Plasmids pAH24 mit *Hind*III linearisiert (II 2.1.7), durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (II 2.1.5) und präzipitiert (II 2.1.6). Das Pellet wurde in 10 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst und der Reaktionsansatz nach Zugabe von 2 µl '10x Transcription buffer', 40 U T3-RNA-Polymerase, 2 µl 'NTP labeling mixture(10x)' und 20 U 'RNase inhibitor' mit DEPC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Umschreibung der DNA in RNA erfolgte bei 37°C für 2 h. Die DNA-Matrize wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNaseI (10 U/µl) und Inkubation für 15 min bei 37°C entfernt. Die DNase-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und die *in vitro*-transkribierte DIG-markierte RNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 96%igem Ethanol gefällt. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Markierungseffizienz der hergestellten Dig-RNA-Sonde wurde durch den Vergleich mit einer markierten Kontroll-RNA bestimmt. Verdünnungsreihen beider Proben wurden auf einer Nylonmembran fixiert (UV-Stratalinker) und direkt durch Inkubation mit dem anti-Dig-AP-Konjugat und Färbung mit NBT/BCIP-Substratlösung (175 µg/ml BCIP bzw. 350 µg/ml NBT in AP-Puffer) entwickelt. Die Spezifität der

hergestellten Sonde wurde durch ihr Hybridisierungsverhalten in Bezug auf Kontrollplasmide (z.B. pBlueScript) wie zuvor beschrieben getestet. Die Herstellung einer Dig-markierten GAPDH-Sonde erfolgte unter Verwendung des Plasmids pBS/GAPDH nach gleichem Protokoll.

II 2.1.23 Hybridisierung

Auf einer Nylonmembran immobilisierte RNA wurde mit Dig-markierten RNA-Sonden hybridisiert. Dazu wurde die Membran zunächst für mindestens 1 h in HSDS-Lösung (50% Formamid, SSC(5x), 50 mM Natriumphosphat, 7% SDS, 0,1% N-Laurylsarcosine, 2% Blocking Reagenz) bei 65°C im Hybridisierungssofen oder eingeschweißt im Wasserbad prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte für 16 h bei 65°C in HSDS-Lösung. Die Sonden wurden zuvor auf 65°C angewärmt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 15 min bei RT in SSC(2x) mit 0,1% SDS und einmal für 30 min bei 68°C in SSC(0,1x) mit 0,1% SDS gewaschen. Nach Äquilibration der Membran in Maleinsäure-Puffer (100 mM Maleinsäure pH 7,5, 150 mM NaCl) wurde diese für 60 min bei RT in 1% Blockingreagenz in Maleinsäure-Puffer abgesättigt und anschließend mit anti-Dig-AP-Konjugat in Absättigungslösung (1:10000) für 30 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde zweimal bei RT für 15 min in Maleinsäure-Puffer mit 0,3% Tween 20 gewaschen und für 5 min in AP-Puffer äquilibriert. Die Detektion der hybridisierten Dig-markierten RNA-Sonde erfolgte mit CSPD (II 2.1.24).

II 2.1.24 Chemilumineszenzreaktion mit CSPD

Die Dephosphorylierung des CSPD durch die Alkalische Phosphatase führt zu Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm. Zur Detektion der anti-Dig-AP-Konjugate wurde die in AP-Puffer äquilibrierte Nylonmembran (II 2.1.23) für 2 min bei RT mit CSPD-Lösung (CSPD, 1:100 in AP-Puffer oder ‚CSPD ready to use‘) versetzt. Zur Verstärkung der Signalintensität wurde die Membran für 30 min auf 37°C erwärmt. Die anschließende Exposition auf einem Röntgenfilm dauerte je nach Signalstärke zwischen 15 s und 60 min.

II 2.2 Zellbiologische Methoden

II 2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. CHO-Zellen wurden in DMEM HAM's F12 unter Zusatz von 1 mM Natriumpyruvat und 5% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Lec2-Zellen wurden in α -MEM, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 10% FCS, NIH 3T3 Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert. Das Kulturmedium für COS-Zellen war DMEM mit 5% FCS und 2 mM L-Glutamin. Zudem wurde allen Medien Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml) zugesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (alle 3 bis 4 Tage). Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgte mit PBS/EDTA oder Trypsin/EDTA.

II 2.2.2 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen zunächst wenige Minuten auf Trockeneis gelagert, dann bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und schließlich tropfenweise mit dem zehnfachen Volumen Auftaumedium (Kulturmedium mit doppelter FCS-Konzentration) verdünnt. Nach der Sedimentation (200xg, 10 min, RT) wurden die Zellen in frischem Auftaumedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert.

II 2.2.3 Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden mit PBS/EDTA oder Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und sedimentiert (200xg, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (Kulturmedium mit insgesamt 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und in Stickstoffdampf oder bei -70°C in Styropor langsam vorgefroren. Nach mindestens 24 h wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

II 2.2.4 Kultivierung von CHO-Zellen zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen

Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen in DMEM HAM's F12 vermehrt und parallel auf bis zu 40 Zellkulturflaschen (700 ml) verteilt. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit proteinfreiem SMIF-Medium kultiviert. Sobald sich eine pH-Wert-Änderung des Medium abzeichnete, was ein Anzeichen für die Stoffwechselaktivität der Zellen war, wurde das Medium abgenommen und durch neues SMIF-Medium ersetzt. Der so gewonnene Zellkulturüberstand wurde von Zelltrümmern und sonstigen Partikeln befreit (3000xg, 10 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren. Dieser Vorgang konnte je nach Vitalität der Zellen bis zu 15mal wiederholt werden.

II 2.2.5 Kultivierung von Hybridoma-Zellen zur Antikörpergewinnung

Hybridoma-Zellen wurden entweder wie unter II 2.2.2 beschrieben oder durch sequentielle 1:2-Verdünnung in einer 24-Loch-Platte aufgetaut. Das Auftaumedium bestand aus DMEM mit 20% FCS und HT-Zusatz. Gegebenenfalls wurde dem Medium Interleukin-6 zugegeben. Die Zellen wurden nun schrittweise von FCS entwöhnt und schließlich in Hybridomed DIF vermehrt. Nach dem Erreichen von einem Zellsuspensionsvolumen zwischen 1 und 2 Liter wurde kein neues Medium mehr zugegeben und weiter kultiviert bis der Großteil der Zellen tot war. Das Medium wurde dann von Zelltrümmern befreit (3000xg, 10 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

II 2.2.6 Solubilisierung von Zellen

Die zu lysierenden Zellen wurden pelletiert (6000xg, 1 min, RT) und einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von einem geeigneten Volumen (z.B. für Zellen einer konfluenten 22-mm-Vertiefung 50 μl , für Zellen einer konfluenten 10-cm-Schale 500 μl) an Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MgCl_2 , 1% NP-40, 1 mM PMSF, 100 U/ml Aprotinin) wurde 20 min auf Eis unter wiederholtem kräftigen Schütteln (Vortex) lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer sedimentiert (14500xg, 20 min, 4°C) und der Überstand entweder direkt analysiert oder darin enthaltene Proteine durch Immunpräzipitation (II 2.3.7) isoliert.

II 2.2.7 Fusion von Zellen

Die zu fusionierenden Zellen wurden im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und ausgesät. Für die Fusion in einer 6-Loch-Platte wurden dazu pro Zellsorte je 4×10^5 Zellen verwendet. Nach Kultivierung über Nacht wurden die Zellen zweimal mit HBSE-Puffer (20 mM Hepes, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EDTA) gewaschen und dann für genau 45 s mit einer 50%igen Lösung von PEG-1500 in Medium versetzt. Zur vollständigen Entfernung des PEG-1500 wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die Analyse erfolgte nach weiterer Kultivierung für 2 Tage.

II 2.2.8 Transiente Transfektion von Zellen

II 2.2.8.1 Transfektion mit LipofectAMINE [169]

LipofectAMINE ist ein Liposomenreagenz aus polykationischen Lipiden, die nach Ultraschallbehandlung in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen bilden, welche dann die DNA nahezu 100%ig aus der Lösung aufnehmen. Der nach außen positiv geladene Liposomen/DNA-Komplex fusioniert nach Adsorption an die Zelloberfläche mit der Plasmamembran, wodurch die DNA direkt in das Zytoplasma gelangt. Dazu wurden $2,4 \times 10^6$ Zellen pro 10-cm-Schale am Vortag der Transfektion ausgesät und kultiviert. Ein Gemisch aus 6 µg DNA, 24 µl LipofectAMINE und 400 µl OptiMEM wurde für 15 bis 45 min bei RT inkubiert. Die idealerweise zu 80% konfluenten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und abschließend bei 37°C und 5% CO₂ mit dem Transfektionsgemisch versetzt. Die Reaktion wurde nach 6 h durch Zugabe von Kulturmedium mit doppelter FCS-Konzentration gestoppt. 24 h nach Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Bei Transfektionen in kleinerem Maßstab wurden die DNA-, LipofectAMINE- und OptiMEM-Mengen entsprechend der zu transfizierenden, bewachsenen Oberfläche reduziert.

II 2.2.8.2 Transfektion mit SuperFect

Das SuperFect Transfektionsreagenz besteht aus aktivierten, stark verzweigten Dendrimeren, die in positiv geladenen Aminogruppen enden. Das Reagenz bildet mit der DNA eine kompakte Struktur, die an negativ geladene Zelloberflächen (z.B. sialylierte Glykoproteine) bindet. Dieses Transfektionsreagenz zeichnet sich gegenüber LipofectAMINE durch eine verminderte Zytotoxizität aus. Dazu wurden 2×10^4 NIH 3T3 Zellen am Vortag der Transfektion in die Vertiefungen einer 12-Loch-Platte ausgesät und kultiviert. Für Immunfluoreszenzen ließ man die Zellen direkt auf Deckgläschen anwachsen. Das Transfektionsgemisch wurde folgendermaßen hergestellt: pro Ansatz wurden 42 µl DMEM ohne Zusätze mit 0,84 µg DNA und 2,08 µl SuperFect versetzt, 10 s lang kräftig vermischt (Vortex) und nach kurzer Zentrifugation mit 250 µl Kulturmedium verdünnt. Dieses Transfektionsgemisch wurde auf die 40 bis 60% konfluenten und mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 3 h wurde das Transfektionsgemisch entfernt, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und diese anschließend in Kulturmedium für 4 bis 16 h kultiviert.

II 2.2.8.3 Transfektion mit Effectene

Bei der Transfektion mit Effectene wird die DNA in einem ersten Schritt mit positiv geladenen ‚Enhancer‘-Molekülen vorinkubiert und dadurch stark kondensiert. Diese komprimierten DNA-‚Enhancer‘-Komplexe werden in einem zweiten Schritt von kationischen nicht-liposomalen Lipiden umschlossen, welche dann durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Im Gegensatz zu den anderen Reagenzien ermöglicht Effectene die Transfektion in Gegenwart von Serum. Dazu wurden 2×10^4 NIH 3T3-Zellen am Vortag der Transfektion in die Vertiefungen einer 12-Loch-Platte direkt auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht kultiviert. Eine Mischung aus 55 µl ‚Buffer EC‘, 0,21 µg DNA und 1,76 µl ‚Enhancer‘ wurde kräftig vermischt (Vortex) und wenige Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 1,7 µl Effectene wurde erneut gemischt (Vortex, 10 s), und nach 10 min bei RT 250 µl Kulturmedium hinzugegeben. Die zu 40 bis 60% konfluenten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 700 µl Kulturmedium versetzt, bevor das Transfektionsgemisch hinzugegeben wurde. 24 h nach der Transfektion konnten die Zellen analysiert werden. Ein weiterer Medienwechsel war nicht nötig.

II 2.2.9 Immunzytochemie

PSA auf Zelloberflächen kann mit Hilfe des Antikörpers 735 dargestellt werden. Die zu testenden Zellen wurden dazu einmal mit PBS gewaschen und mit Methanol/Aceton (1:1) für 5 min bei RT fixiert. Nach dem Entfernen

der Fixierlösung wurden die Zellen kurz bei RT getrocknet und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach 30minütigem Absättigen unspezifischer Bindungen mit 2% Magermilch in PBS wurden die Zellen 60 min mit dem primären Antikörper (mAk 735, 1:2000 in 2% Magermilch in PBS) inkubiert. Auf das viermalige Waschen der Zellen mit PBS folgte eine 30minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-Ig-AP-Konjugat, 1:2000 in 2% Magermilch in PBS). Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Die Alkalische Phosphatase wurde durch Inkubation mit Substratlösung (175 µg/ml BCIP bzw. 350 µg/ml NBT und 5 µM Levamisol in AP-Puffer) nachgewiesen. Unter dem Lichtmikroskop konnte man die PSA-positiven Zellen nach ca. 60 min durch eine violette Färbung erkennen.

II 2.2.10 Zytochemischer Nachweis von β -Galaktosidase

Zur Kontrolle und Optimierung von Transfektionseffizienzen wurden Parallelansätze mit dem Vektor pCMVlacZ, der das Gen für die prokaryontische β -Galaktosidase trägt [170], transfiziert. Der qualitative Aktivitätsnachweis des Enzyms erfolgte zytochemisch. Plasmidtragende Zellen sind durch die β -Galaktosidase in der Lage, X-Gal in Galaktose und Indoxyl-Moleküle, welche durch Oxidation den blauen Farbstoff Indigo ergeben, zu spalten. Hierzu wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS für 10 min in Glutaraldehyd-Lösung (0,625% Glutaraldehyd in PBS) fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS bei 37°C mit Substrat-Lösung (1 mg/ml X-Gal, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 2 mM $MgCl_2$ in PBS) lichtgeschützt inkubiert. Nach mehreren Stunden konnte die Transfektionseffizienz im Lichtmikroskop anhand blau gefärbter Zellen abgeschätzt werden.

II 2.2.11 Immunfluoreszenz

Nach der Transfektion mit SuperFect (II 2.2.8.2) oder Effectene (II 2.2.8.3) wurden die auf Deckgläschen gewachsenen NIH 3T3-Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 0,2% Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation (15 min, 37°C) mit 20% Pferde-Serum in PBS abgesättigt. Die Anlagerung des primären Antikörpers (anti-Flag M5 5 µg/ml, anti- α MannosidaseII-Serum 1:2000, anti-Calnexin-Serum 1:100 in 20% Pferde-Serum in PBS) erfolgte für 1 h bei 37°C. Vor und nach der 60minütigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:250 in 20% Pferde-Serum in PBS) bei 37°C im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Vor dem Fixieren der Deckgläschen in Moviol, wurden diese mehrmals vorsichtig in Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei RT getrocknet und konnten bei 4°C gelagert werden.

II 2.3 Proteinbiochemische Methoden

II 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in der SDS-PAGE. Der Polyacrylamidanteil der 0,8 mm dicken Gele betrug im Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS) 3% und im Trenngel (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS) zwischen 7 und 12%. Dazu wurde eine 40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (29:1) verwendet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 1/100 Volumen 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung und 1/1000 Volumen TEMED gestartet. Zur Denaturierung wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und entweder für 5 min im siedenden Wasserbad oder zur Erhaltung der hitzelabilen PSA-Ketten für 20 min auf 60°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 8 V/cm und nach Erreichen des Trenngels bei 20 V/cm in Elektrophoresepuffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycin, 0,1% SDS). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine entweder auf Nitrocellulose übertragen oder mit Hilfe einer Silberfärbung oder Roti-Blue-Färbung im Gel sichtbar gemacht. Radioaktive Gele wurden direkt getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

II 2.3.2 Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in einer Lösung aus 30% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert. Es folgte eine zweite 15minütige Fixierung in einer Mischung aus 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutardialdehyd und 0,2% Natriumthiosulfat. Dann wurde das Gel dreimal für je 20 min in H₂O bidest. geschwenkt und anschließend für genau 5 min in Silbernitrat-Lösung (0,1% AgNO₃, 0,01% Formaldehyd) gebadet. Nach kurzem Waschen des Gels in H₂O bidest. erfolgte die Entwicklung mit einer Lösung aus 2,5% Na₂CO₃ und 0,01% Formaldehyd. Die Reaktion wurde durch Abspülen mit Wasser und Schwenken des Gels in 0,05 M EDTA gestoppt.

II 2.3.3 Roti-Blue-Färbung

Roti-Blue ist eine kolloidale Coomassie-Lösung, die zur spezifischen Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen geeignet ist. Zur Färbung wurden die Proteingele für 2 h in Roti-Blue in 20% Methanol geschüttelt. Die Entfernung der Farbkomplexe aus der Gelmatrix fand anschließend durch Schwenken des Gels für ca. 1 h in 25% Methanol statt.

II 2.3.4 Western Blot

Durch SDS-PAGE (II 2.3.1) aufgetrennte Proteine wurden im ‚SemiDry‘-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Proteingel wurde dazu in einer ‚Fastblot‘-Kammer auf eine Nitrocellulosemembran, welche sich zwischen jeweils drei Lagen Filterpapier befand, luftblasenfrei aufgelegt. Die Membran und die Filterpapiere waren zuvor mit Blotpuffer (50 mM Tris-HCl, 40 mM Glycin) getränkt worden. Der Proteintransfer fand über 1,5 h bei 2 mA/cm² statt. Anschließend wurde die Membran zur Überprüfung des Transfers und zur Darstellung der Molekulargewichtsmarker in Ponceau S-Lösung (0,2% w/v Ponceau S in 3% TCA) gefärbt, die Markerbanden markiert und der Farbstoff anschließend unter fließendem Wasser wieder entfernt.

II 2.3.5 Immunfärbung von Western Blots

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran nach Western Blot und Ponceau S-Färbung für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C in 2% Magermilch in PBS geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, welche entweder bei RT für 1 bis 2 h oder bei 4°C über Nacht durchgeführt wurde. Antikörperversdünnungen (5 µg/ml bei gereinigten mAks, 1:1000 bis 1:3000 bei Antikörpern aus Ascites) wurden mit 2% Magermilchpulver in PBS angesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS wurde die Lösung mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-Ig-AP-Konjugat 1:2000) auf die Membran gegeben und ca. 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit AP-Puffer wurden die spezifisch markierten Proteine auf der Membran mit Substratlösung (175 µg/ml BCIP bzw. 350 µg/ml NBT in AP-Puffer) angefärbt. Die Farbreaktion wurde nach 10 bis 60 min durch Spülen mit Wasser gestoppt.

II 2.3.6 Kopplung von Antikörpern an ProteinG

Zur Kopplung von Antikörpern an ProteinG-Sepharose wurden je 2 mg Antikörper in 10 ml PBS über Nacht bei 4°C an 1 ml gequollene ProteinG-Sepharose angelagert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 mM Natriumtetraborat pH 9,0 erfolgte die kovalente Kopplung durch 30minütige Inkubation mit Dimethylpimelimidat (20 mM, in 200 mM Natriumtetraborat pH 9,0). Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen und anschließende zweistündige Inkubation mit 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gestoppt. Alle Inkubationen wurden unter leichtem Schwenken ausgeführt. Nach abschließendem zweimaligem Waschen in PBS wurden die an Sepharose gekoppelten Antikörper bei 4°C in PBS mit 0,02% NaN₃ gelagert.

II 2.3.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation diente zur spezifischen Anreicherung von Proteinen aus Zellsolubilisaten oder aus verdünnten Lösungen, wie z.B. Zellkulturüberständen. Dazu wurden ca. 20 µl mit Antikörper kovalent beladene Sepharose (bezogen auf das Volumen der gequollenen Sepharose) in einem Volumen von 1,5 ml der zu extrahierenden Lösung (z.T. wurde mit PBS aufgefüllt) bei 4°C für 1 bis 2 h oder über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Sepharosematrix zweimal mit PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 30 s bei 5000xg durchgeführt. Anschließend wurden die Proben entweder mit 20 µl Laemmli(2x)-Probenpuffer versetzt und in der SDS-PAGE (II 2.3.1) analysiert oder enzymatischen Behandlungen unterzogen.

II 2.3.8 Endo NE-Verdau

Für die spezifische Depolymerisation von PSA mit der Endoneuraminidase NE (Endo NE) wurden Zellsolubilisate oder immunpräzipitierte Proteine für 30 min bei 37°C mit 2 µl (50 µg/ml) Endo NE in PBS verdaut.

II 2.3.9 Exoneuraminidase-Verdau

Zum schrittweisen enzymatischen Abbau von Polysialinsäure wurde Exoneuraminidase aus *Vibrio cholerae* eingesetzt. Das Enzym wurde in einer 1:10- bis 1:20-Verdünnung in der Gegenwart von 2 mM CaCl₂ bei 37°C für 30 min mit dem zu desialylierenden Protein versetzt.

II 2.3.10 PNGaseF-Verdau

PNGaseF ist ein Enzym, welches selektiv N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratstrukturen vom Proteingerüst abspaltet. Zum Verdau wurde PNGaseF (25 U/µg = 1 U/µl) entweder direkt oder aus einer Vorverdünnung in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 12,5 mM EDTA und 50% Glycerin eingesetzt. Die Endkonzentration an Enzym im Ansatz betrug zwischen 0,005 und 0,1 U/µl. Die Inkubationszeiten bei 37°C wurden zwischen 1 min und 18 h variiert. Die Analyse des Verdau erfolgte durch SDS-PAGE (II 2.3.1) und Silberfärbung (II 2.3.2) oder Western Blot (II 2.3.4, II 2.3.5).

II 2.3.11 Alkylierung mit ABDF [171]

ABDF ist ein Alkylierungsreagenz, welches mit Thiol-Gruppen (z.B. freien Cysteinen) ein fluoreszierendes, säurestabiles Konjugat bildet, dessen Detektion unter UV-Licht möglich ist. In Kombination mit einem Reduktionsmittel, z.B. TCEP, lassen sich dann die Disulfidbrücken eines Proteins quantitativ bestimmen. Zur Alkylierung wurde das Protein (Endkonzentration 0,2 mg/ml) mit ABDF (10x-Stammlösung: 40 mM ABDF in DMSO) in Alkylierungspuffer (100 mM NaBO₃, 2 mM EDTA, 3% SDS, pH 8) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Bei gleichzeitiger Reduktion und Alkylierung wurde dem Ansatz TCEP (20x-Stammlösung: 40 mM TCEP in DMSO) zugesetzt. Bei sequentieller Reduktion und Alkylierung wurde das Protein mit TCEP bei 60°C für 10 min reduziert und dann ABDF zugegeben. Zur Sichtbarmachung des Proteinmarkers unter UV-Licht musste dieser ebenfalls alkyliert werden. Die Proben wurden durch SDS-PAGE (II 2.3.1) aufgetrennt und die fluoreszierenden Proteine unter UV-Licht visualisiert. Zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge wurde das SDS-Gel anschließend mit Roti-Blue (II 2.3.3) oder Silbernitrat (II 2.3.2) gefärbt.

II 2.3.12 Ankonzentrierung von Proteinen (Filtron)

Zur Ankonzentrierung von Proteinen aus bis zu 10 l Zellkulturüberstand wurde das Filtron-Gerät der Firma Gelman Science und eine ‚10K open‘-Kassette mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Die Kassette wurde in 0,3 M NaOH mit 0,05% Natriumazid bei 4°C gelagert. Nach dem Einbau der Kassette wurde das Gerät inklusive aller Schläuche gründlich gespült. Der durch Zentrifugation (4000xg, 10 min, 4°C) partikelfreie und filtrierte (0,8 µm) Zellkulturüberstand wurde nun auf 100 bis 250 ml je nach Ausgangsmenge ankonzentriert. Das Konzentrat wurde abgelassen und das Gerät zweimal mit ca. 50 ml PBS im Normalbetrieb (~2 bar, interne Schleife) nachgespült. Der Nachspülpuffer wurde mit dem Konzentrat vereinigt und darin enthaltene Präzipitate durch Zentrifugation (4000xg, 10 min, 4°C) entfernt. Das Gerät wurde nun intensiv mit Wasser und mit 1 M NaOH im Normalbetrieb gespült, bis auf der Kassette keine Rückstände (z.B. Farbstoffe) mehr nachweisbar waren.

II 2.3.13 Proteinaufreinigung

II 2.3.13.1 Antikörper

Zur Aufreinigung von Antikörpern wurde ein Verfahren angewendet, bei dem der Auftrag des Zellkulturüberstandes auf die ProteinG-Sepharose-Säule über Nacht bei 4°C mit Hilfe einer Schlauchpumpe durchgeführt wurde. Das Spülen der Säule und die Elution der Antikörper erfolgte anschließend an der FPLC-Anlage. Zur Aufreinigung des Antikörpers wurde ca. 1 l HybridoMED-Zellkulturüberstand im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und filtriert (0,8 µm). Die in 20% Ethanol gelagerte Säulenmatrix wurde langsam mit filtriertem PBS gespült. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand bei einer Durchflussrate von ca. 1 ml/min bei 4°C über Nacht auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einbau der beladenen Säule in die FPLC-Anlage wurde diese mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 (filtriert und entgast) bei 1 ml/min gespült bis die Grundlinie erreicht war. Dann wurde mit 0,1 M Glycinpuffer pH 2,7 (filtriert und entgast) eluiert und Fraktionen à 1 ml aufgefangen. Die Fraktionen, in denen Protein detektiert worden war, wurden zusammengegeben, mit 1 M Tris-Puffer pH 9,5 neutralisiert und nach Zusatz von 0,02% Azid bei 4°C gelagert. Die Säule wurde zuerst mit ca. 10 ml Glycinpuffer und dann mit ca. 25 ml Phosphatpuffer gespült, aus der FPLC-Anlage ausgebaut und über Nacht wie zuvor beschrieben erneut mit Antikörper beladen. Dazu wurde der schon einmal extrahierte Zellkulturüberstand verwendet. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis im Elutionsprofil kein Protein mehr zu detektieren war. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt (II 2.3.14) und durch Ankonzentrierung im Fugisep mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa auf ca. 1 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde erneut die Proteinkonzentration überprüft, die Antikörper-Lösung aliquotiert und bei -70°C gelagert. Zusätzlich wurde der aufgereinigte Antikörper in der SDS-PAGE analysiert (II 2.3.1).

II 2.3.13.2 MycHis-Fusionsproteine

Zur Aufreinigung von MycHis-Fusionsproteinen aus dem Zellkulturüberstand von stabil transfizierten 2A10-Zellen wurde eine Säule mit 3 bis 4 ml 9E10-gekoppelter ProteinG-Sepharose benutzt. Die Anlagerung des durch Zentrifugation (4000xg, 10 min, 4°C) partikelfreien und filtrierten (0,8 µm) Zellkulturüberstandes an die Gelmatrix fand nach intensiver Spülung der Säule mit PBS je nach Volumen des zu extrahierenden Materials über Nacht bei 4°C und einer Durchflussrate von ca. 1 ml/min oder im ‚Batch‘-Ansatz mit anschließender Abtrennung der Gelmatrix in einer Leersäule statt. Die beladene Säule wurde dann bei 4°C mit 10 Säulenvolumina PBS und 10 Säulenvolumina Hochsalz-PBS (insgesamt 500 mM NaCl) gewaschen. Alle Säulendurchläufe wurden aufgefangen und Aliquots (1,5 ml) davon zur späteren Analyse abgenommen. Die Elution erfolgte manuell mit 0,1 M Glycinpuffer pH 2,7 in Fraktionen à 1 ml, die sofort mit 1 M Tris-Puffer pH 9,5 neutralisiert wurden. Vor dem Einfrieren wurden jeder Fraktion Aliquots entnommen und zur späteren Analyse

mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Säule wurde intensiv mit PBS gewaschen, bevor der schon einmal extrahierte Zellkulturüberstand erneut angelagert wurde. Die in den 1,5 ml-Aliquots der Waschpuffer und die in den Aliquots des Zellkulturüberstandes vor und nach der Extraktion vorhandene Menge an Fusionsprotein wurde durch Immunpräzipitation mit 9E10-ProteinG-Sepharose (II 2.3.7), SDS-PAGE (II 2.3.1) und Western Blot bestimmt (II 2.3.4, II 2.3.5). Die Aliquots der Fraktionen wurden ebenfalls durch SDS-PAGE und Western Blot, sowie durch SDS-PAGE und Silberfärbung (II 2.3.2) analysiert. Die Aufreinigung wurde so oft wiederholt, bis kein Fusionsprotein mehr im Zellkulturüberstand vorhanden war.

II 2.3.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung wurde das BCA-Proteinreagenz verwendet. Dieses Reagenz eignet sich zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration und beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen, die durch Proteine in alkalischem Milieu vorangetrieben wird. Die Cu^+ -Ionen gehen mit zwei BCA-Molekülen (BCA für ‚Bicinchonic Acid‘) einen wasserlöslichen Komplex ein, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Gemäß der Herstelleranweisung wurden die Reagenzien A und B kurz vor Gebrauch im Verhältnis 50 + 1 gemischt und 200 μl Gebrauchsreagenz mit je 10 μl Probenverdünnung (50 bis 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Standard (fünf verschiedene BSA-Verdünnungen im Konzentrationsbereich von 25 bis 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und für 30 min bei 55°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte in 96-Loch-Mikrotiterplatten bei 540 nm. Je Standardverdünnung wurden Vierfachwerte, je Probenverdünnung Doppelwerte aufgenommen.

II 2.3.15 Test auf Polysialylierungsaktivität *in vitro*

Die Aktivität der Polysialyltransferasen PST und STX lässt sich über den Einbau des radioaktiv markierten Substrates [^{14}C]-CMP-Neu5Ac in ihr Produkt PSA qualitativ bestimmen. Beide Enzyme bilden PSA zum einen an ihrem natürlichen Akzeptor, dem Neuralen Zelladhäsionsmolekül (NCAM-Polysialylierung) und zum anderen in einer autokatalytischen Reaktion an sich selbst (Autopolysialylierung). In beiden Fällen wurden die reagierenden Proteine zuvor durch Immunpräzipitation (II 2.3.7) aus dem Zellkulturüberstand von transient transfizierten 2A10-Zellen (II 2.2.8.1) an Sepharose gebunden, bevor [^{14}C]-CMP-Neu5Ac als Substrat zugegeben wurde. Der Nachweis erfolgte über SDS-PAGE (II 2.3.1) und Autoradiographie. Jeder Test wurde mindestens einmal komplett wiederholt.

II 2.3.15.1 Autopolysialylierung

Im Test auf Autopolysialylierung wurden die im Zellkulturüberstand von transient transfizierten 2A10 Zellen enthaltenen MycHis-Fusionsproteine mit ca. 20 μl gequollenen 9E10-ProteinG-Sepharose-Partikeln bei 4°C für 1 bis 2 h immunpräzipitiert. Durch sequentielle Immunpräzipitationen wurden bis zu 6 ml Zellkulturüberstand zur Anreicherung des Fusionsproteins extrahiert. Alle Zentrifugationen zum Pelletieren der Gelmatrix erfolgten für 30 s bei 5000xg und RT. Nach Abschluss der Immunpräzipitation wurde das Gelmaterial dreimal mit Cacodylatpuffer (10 mM Natriumcacodylat, 10 mM MnCl_2 , pH 6,0) gewaschen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen CMP- ^{14}C Neu5Ac (25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ bzw. 291 mCi/mmol) in ca. 60 μl Cacodylatpuffer gestartet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C unter kräftigem Schütteln wurden die Sepharose-Partikel zweimal mit PBS gewaschen. In einigen Fällen folgte ein Verdau mit Endoneuraminidase NE in ca. 50 μl PBS (II 2.3.8). Diese Proben wurden dann erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurde bei allen Proben der Überstand komplett abgenommen und 20 μl Laemmli-Puffer(2x) mit 5% β -ME hinzugegeben. Vor dem Auftrag auf ein 7%iges SDS-Gel wurden die Proben 30 min bei 65 °C denaturiert.

II 2.3.15.2 NCAM-Polysialylierung

Zum Test auf NCAM-Polysialylierungsaktivität wurde zusätzlich zu den Polysialyltransferasen eine lösliche Form des NCAM-140 mit ProteinA-Fusionsanteil an die Gelmatrix angelagert. ProteinA bindet in diesem Fall an den Fc-Teil der 9E10-Antikörper, die ebenfalls das Polysialyltransferase-MycHis-Fusionsprotein gebunden haben. ProteinA-NCAM wurde entweder aus frischem Zellkulturüberstand transient transfizierter 2A10-Zellen (Plasmid: pBT4) oder aus dem bei -20°C zwischengelagerten Zellkulturüberstand stabil transfizierter 2A10 Zellen (2A10-ProtA-NCAM) immunpräzipitiert. Nach der Immunpräzipitation (2 h, 4°C) wurden die Gel-Partikel dreimal mit Cacodylatpuffer, wie zuvor für die Autopolysialylierung beschrieben, gewaschen und weiterbehandelt. In Abb. 7 ist der Ablauf des Aktivitätstest schematisch dargestellt.

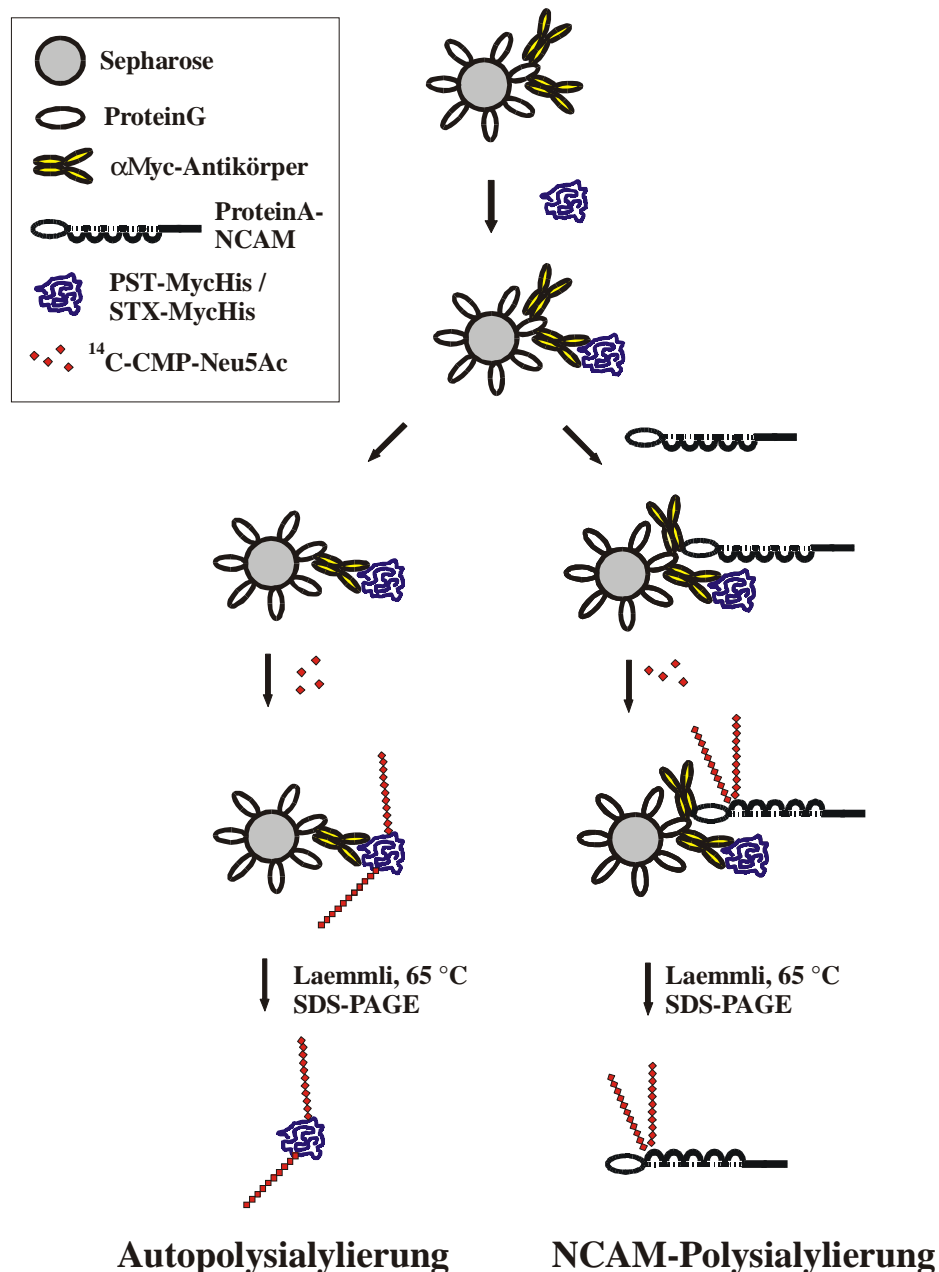


Abb. 7: Schematische Darstellung des *in vitro*-Tests auf Auto- und NCAM-Polysialylierungsaktivität.

III ERGEBNISSE

III 1 Molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10

Die Komplementationsgruppe 2A10 ist vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor aus CHO-K1-Zellen durch chemische Mutagenese und Selektion der PSA-negativen Klone hergestellt worden. Da CHO-K1-Zellen funktionell haploid sind, spiegeln sich alle Mutationen im Phänotyp der Zellen wieder [172]. Die Komplementationsgruppe 2A10 besteht aus 31 Subklonen, die aus neun unabhängigen Mutageneseansätzen hervorgegangen sind. 2A10-Zellen wurden daraufhin zur Klonierung der Polysialyltransferase (auch PST-1 oder ST8SiaIV) benutzt [137].

Die molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10 sollte nun dazu dienen, Mutationen im PST-Gen, welche zu einem funktionell inaktiven Enzym führen und somit auf essentielle Aminosäuren hinweisen, zu identifizieren.

III 1.1 RNA-Präparation und Northern Blot-Analyse

Um Informationen über die Expression von PST-Transkripten in Zellen der Komplementationsgruppe 2A10 zu erhalten, wurden alle Subklone im Northern Blot analysiert. Als Kontrollzelllinie wurden CHO-K1- oder CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 verwendet. Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 haben ein defektes Gen für den CMP-Neu5Ac-Transporter [158]. Zur Darstellung von PST-Transkripten im Northern Blot war es notwendig, hochgereinigte mRNA (poly(A⁺)-RNA) zu verwenden. Dazu wurde aus ca. 1×10^8 Zellen jedes 2A10-Klons, was ungefähr 10 konfluent bewachsenen 750-ml-Zellkulturflaschen entspricht, über Guanidiniumisothiocyanat-Extraktion und anschließende CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation die gesamt-RNA isoliert (II 2.1.16). Die Isolierung der hochreinen poly(A⁺)-RNA aus ca. 1 mg gesamt-RNA erfolgte durch zweimalige Anwendung des ‚Oligotex mRNA Kits‘ (II 2.1.17). Tab. 3 gibt eine Übersicht über die pro Klon eingesetzten Zellmengen sowie die erzielten gesamt-RNA- und poly(A⁺)-RNA-Ausbeuten.

2A10-Klon	eingesetzte Anzahl an Zellen [x10 ⁸]	Ausbeute an gesamt-RNA [mg]	eingesetzte gesamt-RNA [mg]	Ausbeute an poly(A ⁺)-RNA [µg]
CHO-K1	1,24	0,99	0,99	2,6
Lec2 (1E3)	0,43	0,56	0,56	11,2
1C5	1,12	1,8	1	n.b.
1D7	0,93	2,9	0,96	6,5
1E6	1,2	1,4	1	6,2

2A10-Klon (Fortsetzung)	eingesetzte Anzahl an Zellen [x10 ⁸]	Ausbeute an gesamt-RNA [mg]	eingesetzte gesamt-RNA [mg]	Ausbeute an poly(A ⁺)-RNA [µg]
1G4	1,08	1,3	1	5,2
1H8	0,95	1	1	9,6
2A10	1,5	2	1	6,6
2B12	1,3	1,3	1	3,3
2D8	1,03	1	1	6,6
2D5	0,98	2	1	3
2E11	1,36	1,3	0,63	6,6
2G8	1,1	1,2	0,98	11
3A7	1,04	1,5	0,75	5
3C7	1,7	1,5	0,75	6,1
3F3	1,1	1	1	9,3
4C4	1,3	1,8	0,9	25
4D11	1,2	1,8	0,9	3,1
4E8	0,6	0,44	0,44	9,4
5C3	0,96	2,16	1,08	3,5
5C9	0,7	1,2	1	11,8
5F4	1,2	1,4	1	10
6B8	0,83	2,3	1	31 (?)
6E5	1	1,1	1,02	11
7F11	1,3	1	1,05	4,8
7G9	1,3	1,4	1,02	11
7G11	1,1	1,8	0,9	5,8
8C6	1,2	3	1	11,2
8F8	1,3	1,7	0,85	4,3
8G5	0,9	2,3	1,17	7
9C8	1,3	0,69	0,69	19,6
9D8	1,3	1,5	1	5
9G2	0,72	1,5	0,75	4,1

Tab. 3: Isolation von mRNA aus Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 und aus Kontrollzellen. Aufgeführt sind die eingesetzte Anzahl an Zellen, die Ausbeute an gesamt-RNA und die Ausbeute an poly(A⁺)-RNA.

Die Ausbeuten an gesamt-RNA aus ca. 1x10⁸ Zellen lagen im Bereich zwischen 1 und 3 mg, die an poly(A⁺)-RNA aus ca. 1 mg gesamt-RNA zwischen 3 und 10 µg. Davon abweichende Ausbeuten an poly(A⁺)-RNA basieren auf Messungenauigkeiten, die durch zu geringe Nukleinsäurekonzentrationen in den zur Messung stark verdünnten Lösungen bedingt wurden. Die Konzentration von Proben, die außerhalb des oben erwähnten Konzentrationsbereiches lagen, wurde nach Elektrophorese im Agarosegel erneut abgeschätzt. Für eine Northern Blot-Analyse wurden nun pro Klon je 4 µg poly(A⁺)-RNA auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (II 2.1.19) und auf eine Nylonmembran übertragen (II 2.1.20). Nach der UV-Fixierung erfolgte die Hybridisierung der Northern Blots mit Digoxigenin-markierten PST-RNA-Sonden (II 2.1.22, II 2.1.23) und die Detektion der gebundenen Sonden durch Chemilumineszenz (II 2.1.24) und Exposition auf einem Röntgenfilm. Nach gründlichem Spülen in DEPC-H₂O wurden die Blots zur Überprüfung der Menge und Qualität der aufgetragenen RNA mit einer Digoxigenin-markierten GAPDH-RNA-Sonde

erneut hybridisiert, entwickelt und exponiert. Zur Veranschaulichung der poly(A⁺)-RNA-Qualität ist in Abb. 8 ein unter UV-Licht aufgenommenes Formaldehyd-Agarosegel und der daraus hervorgegangene Northern Blot nach GAPDH-Hybridisierung aufgeführt. Hier ist erkennbar, dass die Verunreinigungen mit ribosomaler RNA, welche bei ca. 4,4 und 1,8 kb im Gel migrieren, relativ gering waren, und dass die Proben bis auf die Positivkontrolle (wt) in vergleichbaren Mengen aufgetragen wurden. Dieser Befund lässt sich auch durch die GAPDH-Signale bei ca. 1,4 kb bestätigen.

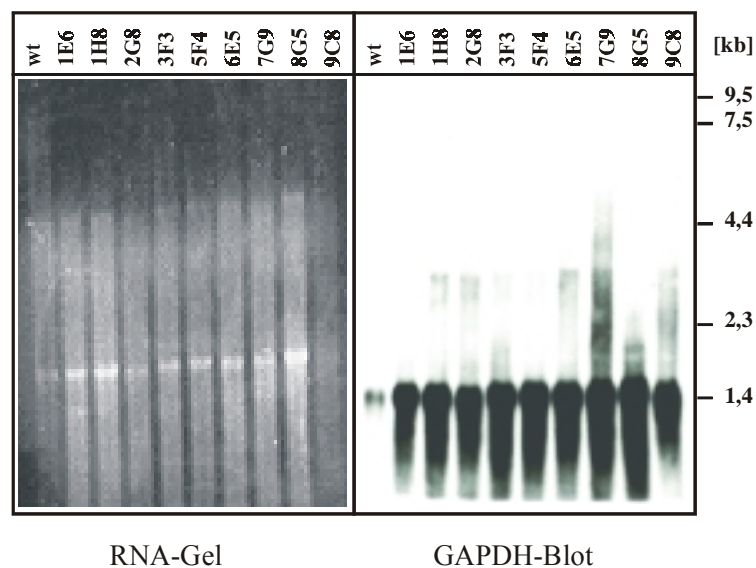


Abb. 8: Vergleich der mRNA-Menge und -qualität im Formaldehyd-Agarosegel und im Northern Blot. Pro Klon wurden je 4 µg poly(A⁺)-RNA im Gel elektrophoretisiert und die aufgetrennte RNA durch Interkalation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Nach dem Übertrag auf eine Nylonmembran wurde mit einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert und entwickelt.

In Abb. 9 sind die Northern Blots aller mRNA-positiven Klone der Komplementationsgruppe 2A10 dargestellt. Überraschenderweise wiesen nur vier von insgesamt 31 Subklonen der Komplementationsgruppe 2A10 die für PST spezifischen Signale bei 6,5 und 2,2 kb auf. Es handelt sich dabei um die Klone 2A10, 2B12, 7G11 und 9C8. Klon 8F8 zeigt für die größere Bande ein Hybridisierungssignal bei 6,1 kb, das auf eine im Bezug zum Wildtyp verkürzte PST-mRNA schließen lässt. Für Klon 9G2 und die anderen hier nicht aufgeführten 25 Klone konnte kein PST-Transkript nachgewiesen werden. Von den positiven 2A10-Klonen weist lediglich Klon 7G11 ein in der Signalstärke mit dem Wildtyp vergleichbares Signal auf. Die Expressionshöhe der PST-Transkripte in den Klonen 2A10, 2B12 und 9C8 war dagegen stark vermindert, wie der Vergleich mit den GAPDH-Signalen bei 1,4 kb verdeutlicht. Für Klon 8F8 fällt nur das Hybridisierungssignal bei 6,1 kb in Bezug zum Wildtyp schwächer aus; die kleinere Bande bei ca. 2,2 kb zeigt dagegen Wildtypintensität.

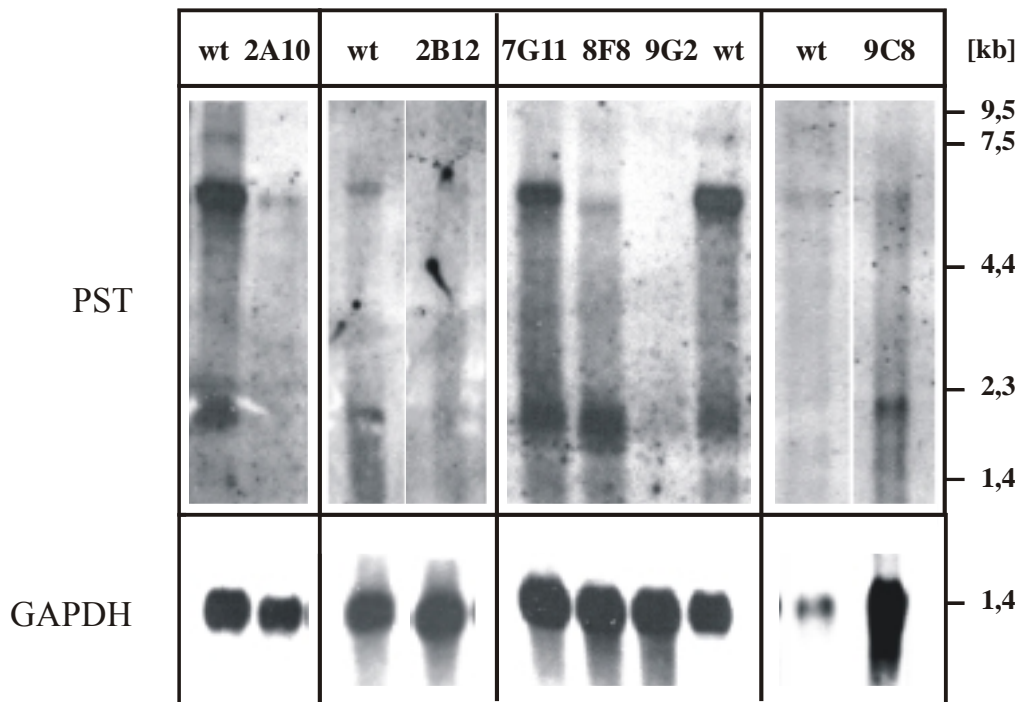


Abb. 9: Northern Blot-Analyse zum Nachweis von PST-mRNA in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10. Pro Klon wurden je 4 µg poly(A⁺)-RNA mit einer PST- und einer GAPDH-spezifischen Sonde sequentiell hybridisiert. Gezeigt ist eine Zusammenstellung aller positiven mRNA-Signale (2A10, 2B12, 7G11, 8F8, 9C8), die in insgesamt vier unabhängigen Experimenten erhalten wurden.

III 1.2 Fusion von 2A10-Zellen

Die Tatsache, dass in der Northern Blot-Analyse auffallend viele Klone der Komplementationsgruppe 2A10 (26 von 31) kein Hybridisierungssignal für PST zeigten, gab Anlaß zu folgender Hypothese: In diesen Klonen könnte ein Protein, das die Transkription reguliert, durch Mutation so verändert worden sein, dass es die Synthese von PST-mRNA inhibiert. Diese Veränderung hätte allerdings einen dominant PSA-negativen Phänotyp erzeugen müssen, da sich diese Klone sonst bei der Einordnung der PSA-negativen Zellklone in Komplementationsgruppen von den Klonen mit PST-Defekt unterschieden hätten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden nun einige Subklone der Komplementationsgruppe 2A10 (3A7, 6B8, 8C6), die kein Northern Blot-Signal zeigten, mit CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 (Subklon 8G8), die einen Defekt im CMP-Neu5Ac-Transporter-Gen aufweisen, fusioniert (II 2.2.7). Die Oberflächenfärbung der fusionierten Zellen mit dem anti-PSA-Antikörper 735 (II 2.2.9) war für alle drei Experimente positiv. Die Beteiligung eines Transkriptionsregulators mit dominantem, inhibierendem Einfluß auf die PSA-Expression kann daher zumindestens für die 2A10-Klone 3A7, 6B8 und 8C6 ausgeschlossen werden.

III 1.3 RT-PCR

Da die RT-PCR im Vergleich zum Northern Blot eine sensitivere Methode zum Nachweis von mRNAs darstellt, wurde parallel versucht, PST-Transkripte aus 2A10-Klonen in cDNA umzuschreiben, anschließend durch PCR zu amplifizieren und dann zu analysieren (II 2.1.18). Die PST-spezifische reverse Transkription von 0,5 bis 2 µg poly(A⁺)-RNA wurde unter Verwendung der Primer ME52 und ME54 wie unter II 2.1.18.1 beschrieben durchgeführt (mehr Informationen über die Primer in Abb. 6). Die anschließende Vervielfältigung der PST-cDNAs erfolgte durch eine PCR mit 40 Zyklen, welche nach der Aufreinigung betreffender PCR-Fragmente über ein Agarosegel zur erneuten Amplifikation noch einmal wiederholt wurde. Jeder Schritt für sich und die Gesamtreaktion wurden durch entsprechende Positiv- und Negativkontrollen überprüft (II 2.1.18.2). Die RT-PCR wurde unter Verwendung von unterschiedlichen mRNA-Qualitäten, mRNA-Konzentrationen und Primerkombinationen für jeden Klon mehrfach durchgeführt. Auch nach der zweiten Amplifikationsrunde wiesen nur wenige Klone die Banden für die amplifizierten PST-cDNAs im Agarosegel auf. Es handelte sich dabei um die Klone 2A10, 2B12, 2D8, 4C4, 5C3, 7G11, 7F11, 9C8 und 9D8. Die Resultate der RT-PCR für die Klone 1C5, 1G4, 2B12 und 2D5 sind in Abb. 10 dargestellt. Die Signale für die Amplifikate der PST-cDNA des Wildtyps und des Klons 2B12 sind bei ca. 1100 bp im Gel deutlich zu erkennen. Für die übrigen Klone konnte keine PST-mRNA nachgewiesen werden.

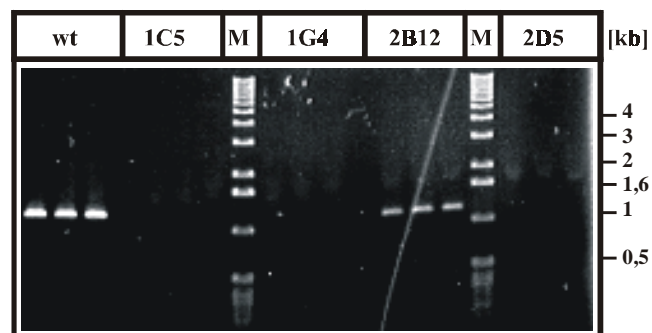


Abb. 10: RT-PCR der Klone 1C5, 1G4, 2B12 und 2D5 im Vergleich zum Wildtyp (wt). Verwendet wurde Primerkombination 7 (Tab. 2). M bezeichnet den Marker.

Klon 8F8 zeigt ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster (Abb. 11). Neben der Bande bei 1,1 kb kann eine zusätzliche, stärkere Bande bei ca. 900 bp detektiert werden. Beide Banden wurden ausgeschnitten und getrennt weiter verarbeitet. Die RT-PCRs für die Klone 2A10, 4C4, 5C3 und 7F11 waren vor Beginn dieser Arbeit von Arnd Manegold im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt worden.

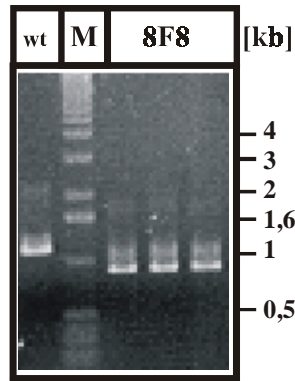


Abb. 11: RT-PCR des Klons 8F8 im Vergleich zum Wildtyp (wt). Verwendet wurde Primerkombination 7 (Tab. 2). M bezeichnet den Marker.

III 1.4 Sequenzierung von cDNAs

Die nach der RT-PCR aus dem Agarosegel extrahierten PST-cDNAs wurden anhand ihrer von der *Taq*-DNA-Polymerase synthetisierten 3'A-Überhänge direkt in den pGEM-T Vektor ligiert (II 2.1.9), in *E. coli* transformiert (II 2.1.12) und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Von mehreren anschließend in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin angeimpften Kolonien wurde nun die Plasmid-DNA isoliert (II 2.1.1) und einligierte DNA-Abschnitte sequenziert (II 2.1.15). Mit Ausnahme des Klons 8F8 wurde in allen Klonen eine oder mehrere Punktmutationen in den PST-mRNAs nachgewiesen. Die Klone 2A10 und 2B12 weisen den selben Nukleotidaustausch auf, der in einem potentiellen Protein zu einem frühzeitigen Stopkodon nach der 34. Aminosäuren führt. Da beide Klone aus einem Mutageneseexperiment hervorgegangen sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei 2A10 und 2B12 um identische 2A10-Subklone handelt. Die Klone 4C4 und 7F11 haben ebenfalls den selben Defekt, der in beiden Fällen zum Aminosäureaustausch Glycin¹⁴⁶→Glutaminsäure führt. Da beide Klone jedoch aus unterschiedlichen Mutageneseexperimenten stammen, kann ausgeschlossen werden, dass es sich hier um identische Klone handelt. Für die Klone 2D8 und 9D8 wurden jeweils zwei Punktmutationen in der PST-cDNA festgestellt. Die PST des Klons 2D8 weist die Aminosäureaustausche Methionin³³³→Valin und Cystein³⁵⁶→Phenylalanin auf. In der PST des Klons 9D8 wurden die Austausch Valin²³⁰→Alanin und Arginin²⁷⁷→Glycin identifiziert. Die Sequenzierungen der PST-cDNAs aus den Klonen 2A10, 4C4, 5C3 und 7F11 waren vor Beginn dieser Arbeit von Arnd Manegold im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt worden. In Tab. 4 sind die in der Komplementationsgruppe 2A10 auftretenden Punktmutationen und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche in der PST zusammengefasst.

Klon	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
2A10	<i>C103T</i>	Glutamin ³⁵ →stop
2B12	<i>C103T</i>	Glutamin ³⁵ →stop
2D8	<i>A997G</i> <i>G1067T</i>	Methionin ³³³ →Valin Cystein ³⁵⁶ →Phenylalanin
4C4	<i>G437A</i>	Glycin ¹⁴⁶ →Glutaminsäure
5C3	<i>G841A</i>	Glycin ²⁸¹ →Serin
7F11	<i>G437A</i>	Glycin ¹⁴⁶ →Glutaminsäure
7G11	<i>G566A</i>	Threonin ¹⁸⁹ →Isoleucin
9C8	<i>G1006A</i>	Glutaminsäure ³³⁶ →Lysin
9D8	<i>T689C</i> <i>A829G</i>	Valin ²³⁰ →Alanin Arginin ²⁷⁷ →Glycin

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 aufgetretenen Punktmutationen in den PST-cDNAs und den daraus resultierenden Aminosäureaustauschen.

Für Klon 8F8 wurden beide in der RT-PCR erhaltenen Banden (siehe Abb. 11) getrennt aus dem Gel aufgereinigt, in den pGEM-T Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Die Sequenzierung der aus der Klonierung der 900 kb-Bande hervorgegangen Plasmide zeigte, dass hier die Deletion der Nukleotide A²⁴⁷ bis G⁵⁰⁴ die von der Wildtyp-cDNA abweichende Größe bedingt. In einem potentiellen Protein würden die Aminosäuren im Bereich von Lysin⁸³ bis Arginin¹⁶⁸, die genau Exon 3 entsprechen, fehlen. Die Klonierung der 1100 kb-Bande führte zu Plasmiden, die zum einen bei ca. 2,8 und zum anderen bei ca. 3 kb im Gel migrierten. Die Sequenzierung ergab bei den 2,8 kb großen Plasmiden zusätzlich zur Deletion von Exon 3 einen Einschub von 85 Nukleotiden zwischen Exon 4 und Exon 5. Die Plasmide mit einer Größe von ca. 3 kb weisen eine Deletion der ersten 24 Nukleotide von Exon 3 und einen Einschub von 66 Nukleotiden anstelle der ersten beiden Nukleotide von Exon 4 auf. In beiden aus der 1100 bp-Bande hervorgegangen Plasmiden wird durch den Nukleotid-Einschub eine Verschiebung des Leserahmens induziert. Der Versuch, homologe Sequenzen zu den 85- bzw. 66-Nukleotid-Einschüben zu finden (BLAST Search, NCBI PubMed), blieb erfolglos. Es kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass es sich um Intronsequenz aus dem PST-Gen handelt. In Abb. 12 sind die für den Klon 8F8 nachgewiesenen Defekte in der PST-cDNA schematisch dargestellt.

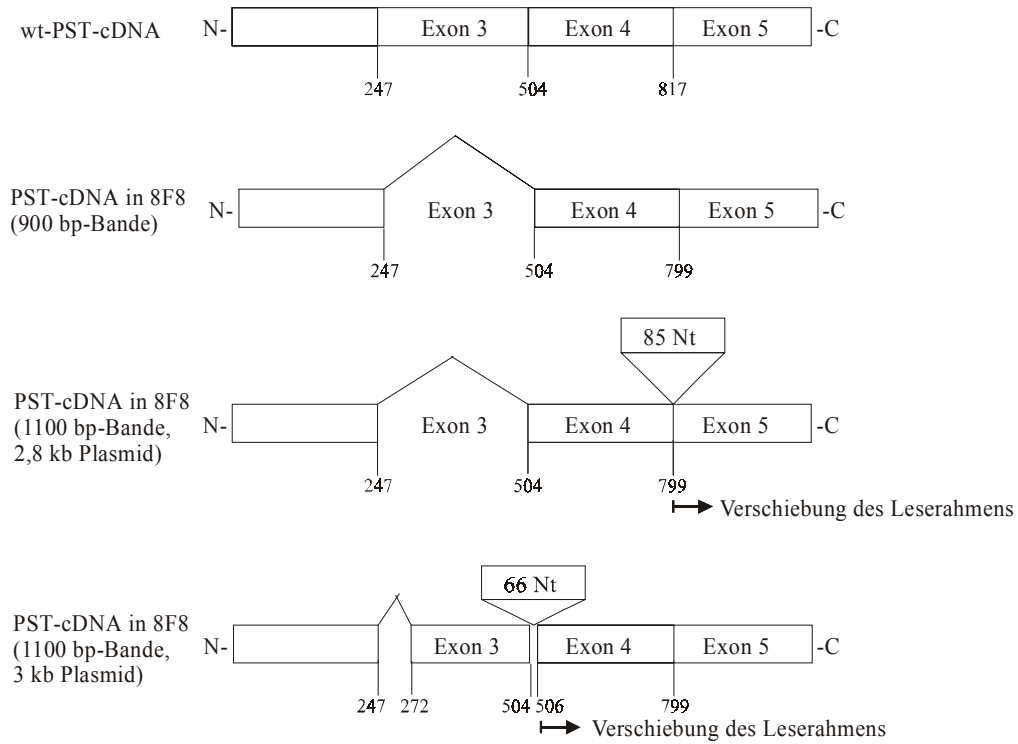


Abb. 12: Schematische Darstellung der Defekte in PST-cDNAs des Klons 8F8, die nach Klonierung und Sequenzierung der RT-PCR-Banden bei 900 bzw. 1100 kb festgestellt wurden.

In Abb. 13 ist der Verlauf und das Ergebnis der Analyse der Komplementationsgruppe 2A10 anhand eines Fließdiagramms zusammengefasst.

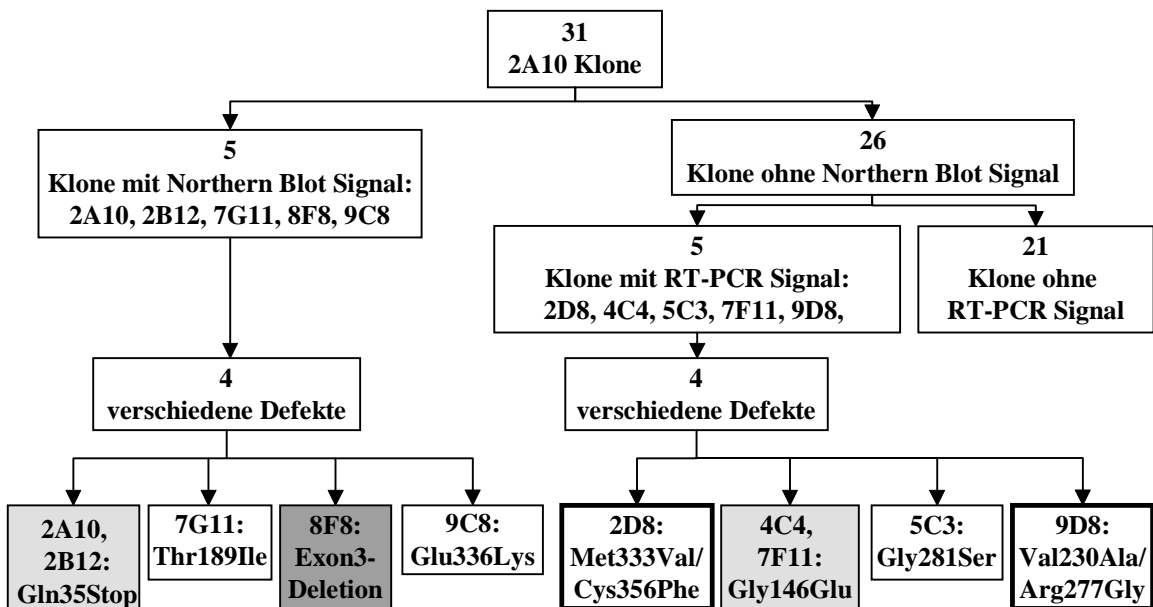


Abb. 13: Fließdiagramm zur Übersicht über den Verlauf der Analyse der Komplementationsgruppe 2A10.

Die Analyse von 31 Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 durch RT-PCR hat demnach in 10 Fällen zu einem Produkt geführt. Für die restlichen 21 Klone konnte keine PST-mRNA nachgewiesen werden. In neun Klonen beruht der Defekt auf Punktmutationen und in einem Klon (8F8) liegt die Deletion eines kompletten Exons vor. Von den neun Klonen mit Punktmutationen weisen zweimal zwei Klone (2A10/2B12 und 4C4/7F11) den gleichen Defekt auf, womit nach dem Abzug der Klone, die eine Stop-Mutation tragen (2A10/2B12), noch sechs Klone zur weiteren Analyse zur Verfügung standen. Von diesen sechs Klonen weisen wiederum zwei Klone jeweils zwei Mutationen auf, was eine Gesamtsumme von acht zu untersuchenden Mutationen ergibt.

Abb. 14 veranschaulicht die Lage der durch 2A10-Mutationen betroffenen Aminosäuren im PST-Protein. Man erkennt, dass bis auf Valin²³⁰ und Cystein³⁵⁶ nur Positionen in der Umgebung der Sialylmotive und Aminosäuren direkt in den Motiven betroffen sind. Glycin¹⁴⁶, Glycin²⁸¹ und Glutaminsäure³³⁶ sind sogar Bestandteil des L-, S- bzw. VS-Sialylmotives.

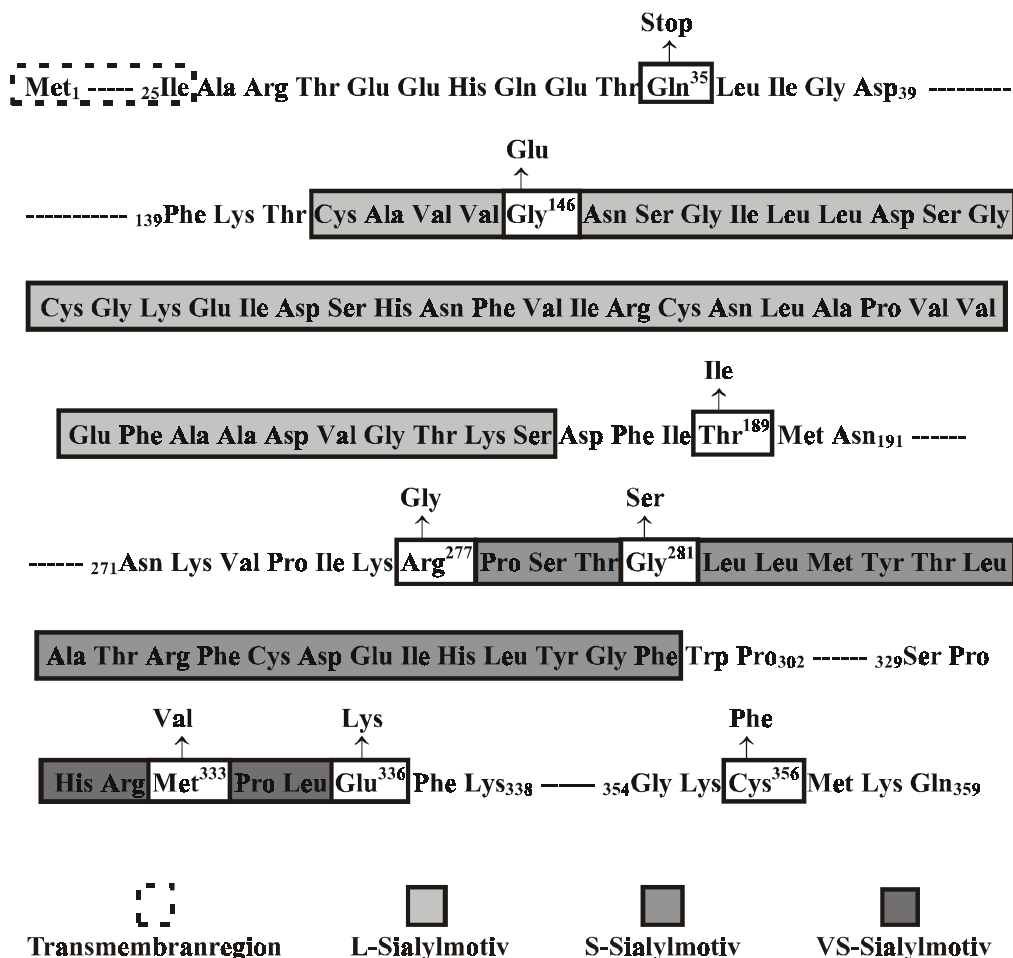


Abb. 14: Schematische Darstellung der durch 2A10-Mutationen bedingten Aminosäureaustausche im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive.

L-Sialylmotiv

ST3Gal I Maus	139CAVV	G	NSGNLKDSSYGPEIDSHDFVLRMNKAPT-VGFEADVGSRTTHH	L	V ₁₈₇
ST3Gal II Maus	152CAVV	G	NSGNLRGSGYGQEVDSHNFIMRMNQAPT-VGFEKDVGSRTTHH	F	M ₂₀₀
ST3Gal III Maus	159CIIV	G	NGGVLANKSLGSRIDDDYDIVIRLNSAPV-KGFERDVGSKTTLR	I	T ₂₀₇
ST3Gal V Maus	167CVVV	G	NGGILHGLELGHALNQFDVVIRLNSAPV-EGYSEHVGNKTTIR	M	T ₁₈₁
ST6Gal I Maus	181CAVV	S	SAGSLKNSQLGREIDNHDAVLRFNAGAPT-DNFQQDVGTKTTIR	L	V ₂₂₉
ST6GalNac II Maus	150CAVV	G	NGGILNGSRQGGQKIDAHDYVFRNLGAIIT-EAFERDVGTKTSFY	G	F ₁₉₈
ST6GalNac III Maus	78CAVV	G	NGGILNGSRQGGQKIDAHDYVFRNLGAIIT-EAFERDVGTKTSFY	G	F ₁₂₆
ST6GalNac IV Maus	124CAVV	S	NSGQMLGSLGAQIDGAECVLRMNQAPT-VGFEEDVGQRTTLR	V	I ₁₇₂
ST6GalNac V Maus	95CALV	T	SSGHLLRSQQGPHIDQTECVIRMNDAPTR-GYGLDVGNRTSLR	V	I ₁₄₃
ST8Sia I Human	138CAVV	G	NGGILKKSQCGRQIDEANFVMRCNLPLSSEYTKDVGSKSQLV	T	A ₁₈₇
ST8Sia I Maus	137CAVV	G	NGGILKMSGCGRQIDEANFVMRCNLPLSSEYTRDVGSKTQLV	T	A ₁₈₆
ST8Sia II Human	157CAIV	G	NSGVLLNSGCGQEIDAHSFVIRCNLAPV-QEYARDVGLKTDLV	T	M ₂₀₅
ST8Sia II Maus	157CAIV	G	NSGVLLNSGCGQEIDTHSFVIRCNRAPV-QEYARDVGLKTDLV	T	M ₂₀₅
ST8Sia II Xenopus	157CAIV	G	NSGILLNSGCGKEIDSHDFVIRCNLAPV-EEYAKDVGTKTNLV	T	M ₂₀₅
ST8Sia III Human	162CAVV	G	NSGILTFIQCGREIDKSDVFVRCNFAPS-EAFQRDVGRTKTNLT	T	F ₂₁₀
ST8Sia III Maus	162CAVV	G	NSGILTGSCGQEIDKSDFVSRCNFAPT-EAFHKDVGRTKTNLT	T	F ₂₁₀
ST8Sia IV Human	142CAVV	G	NSGILLDSECGKEIDSHNFVIRCNLAPV-VEFAADVGTKSDFI	T	M ₁₉₀
ST8Sia IV Maus	142CAVV	G	NSGILLDSECGKEIDSHNFVIRCNLAPV-VEFAADVGTKSDFI	T	M ₁₉₀
ST8Sia IV Hamster	142CAVV	G	NSGILLDSECGKEIDSHNFVIRCNLAPV-VEFAADVGTKSDFI	T	M ₁₉₀
ST8Sia IV Huhn	142CAVV	G	NSGILLDSECGKEIDTHDFVIRCNLAPV-VEFAADVGLKSDFI	T	M ₁₉₀
ST8Sia V Human	164CAVV	G	NGGILKNSRCGREINSADVFVRCNLPPISEKYTMDVGVKTDVV	T	V ₂₁₃
AA-Austausch in 2A10		E			I

s-Sialylmotiv

ST3Gal I Maus	264	-	PST	G	ILSIIFSIHICDEVDLYGF-GADS ₂₉₀	
ST3Gal II Maus	277	-	PST	G	MLVLFALHVCDEVNVYGF-GADS ₃₀₃	
ST3Gal III Maus	299	-	PTL	G	SVAVTMALHGCEVAVAGF-GYDM ₃₂₅	
ST3Gal V Maus	311	-	PTI	G	VIAVVLATHLCDEVSLAGF-GYDL ₃₃₇	
ST6Gal I Maus	318	-	PSS	G	MLGIIIMTMLCDQVDIYEF-LPSK ₃₄₄	
ST6GalNac II Maus	302	-	PST	G	ALMLLTALHTCDQVSAYGF-ITNN ₃₂₈	
ST6GalNac III Maus	211	S	Y	LST	G	WFTFMALAMDACYSIHVYGMINETY ₂₄₀
ST6GalNac IV Maus	257	S	F	LST	G	WFTMIPALELCEEIVVYGMVSDSY ₂₈₆
ST6GalNac V Maus	228	T	W	LST	G	WFTMTIALELCDRIDVYGMVPPDF ₂₅₇
ST8Sia I Human	271	K	R	LST	G	LFLVSAALGLCEEVAIYGFWPF ₃₀₀
ST8Sia I Maus	270	K	R	LST	G	LFLVSAALGLCEEVSYGFWPF ₂₉₉
ST8Sia II Human	291	K	R	PTT	G	LLMYTLATRFCKQIYLYGFWPF ₃₂₀
ST8Sia II Maus	291	K	R	PTT	G	LLMYTLATRFNCQIYLYGFWPF ₃₂₀
ST8Sia II Xenopus	291	K	R	PTT	G	ILMYTLATRFNCRIYLYGFWPF ₃₂₀
ST8Sia III Human	297	K	R	LST	G	ILMYTLASAICEEIHLYGFWPF ₃₂₆
ST8Sia III Maus	297	K	R	LST	G	ILMYTLASAICEEIHLYGFWPF ₃₂₆
ST8Sia IV Human	276	K	R	PST	G	LLMYTLATRFCEIHLYGFWPF ₃₀₅
ST8Sia IV Maus	276	K	R	PST	G	LLMYTLATRFCEIHLYGFWPF ₃₀₅
ST8Sia IV Hamster	276	K	R	PST	G	LLMYTLATRFCEIHLYGFWPF ₃₀₅
ST8Sia IV Huhn	276	K	R	PST	G	LLMYTLATRFCEIHLYGFWPF ₃₀₅
ST8Sia V Human	297	K	R	IST	G	LILVTAALCELCEEVHLFGFWAFPM ₃₂₆
AA-Austausch in 2A10				G	S	

VS-Sialylmotiv

ST3Gal I Maus	310	TGVHD	G	DF	E	YNITTTLAAINKIRIFKGR ₃₃₇	(X73523)		
ST3Gal II Maus	323	TGVHD	A	DF	E	AHIDMLAKASKIEVYRGN ₃₅₀	(X76989)		
ST3Gal III Maus	348	T--HS	I	QR	E	KEFLRKLKVKARVITDLSSG _{I374}	(NM_009176)		
ST3Gal V Maus	358	QVMHN	V	TT	E	TKFLLKLLKEGVVEDLSGG _{I H387}	(Y15003)		
ST6Gal I Maus	374	NMVKH	L	NE	G	TDEDIYLFPGKATLSGFRNN _{R C403}	(D16101)		
ST6GalNac II Maus	347	YANHD	L	SL	E	ASLWRDLHNAGILWLYQR ₃₇₃	(X93999)		
ST6GalNac III Maus	282	KVFAK	W	AK	K	HRIVFTHPNWTLS ₃₀₃	(Y11342)		
ST6GalNac IV Maus	329	AVFSR	W	AK	K	RPVFAHPSWRAK ₃₅₀	(Y15779)		
ST6GalNac V Maus	301	RVFKN	W	AR	T	FNIHFFQPDWKPESPAVNH _A	EGKPVF ₃₃₅	(AB030836)	
ST8Sia I Human	319	SGFHA	M	PE	E	FLQLWYLHKIGALRMQLDP	C	EDTSLQPTS ₃₅₆	(X77922)
ST8Sia I Maus	318	TGYHA	M	PE	E	FLQLWYLHKIGALRMQLDP	C	EEPSPQPTS ₃₅₅	(X84235)
ST8Sia II Human	343	ASPHT	M	PL	E	FKALKSLHEQGALKLTVGQ	C	DGAT ₃₇₅	(NM_006011)
ST8Sia II Maus	343	ASPHT	M	PL	E	FKALKSLHEQGALKLTVGQ	C	DGAT ₃₇₅	(X83562)
ST8Sia II Xenopus	343	AGPHA	M	PL	E	FKALKNLHLQGALKLNVE	C	EAAT ₃₇₅	(AB007468)
ST8Sia III Human	351	QESHQ	L	PA	E	FQLLYRMHGEGLTKLTL	C	A ₃₈₀	(AF004668)
ST8Sia III Maus	351	QESHQ	L	PA	E	FQLLYRMHGEGLTKLTL	C	A ₃₈₀	(A56950)
ST8Sia IV Human	328	ASPHR	M	PL	E	FKTLNVLHNRGALKLTTGK	C	VKQ ₃₅₉	(NM_005668)
ST8Sia IV Maus	328	ASPHR	M	PL	E	FKTLNVLHNRGALKLTTGK	C	MKQ ₃₅₉	(X8Q000)
ST8Sia IV Hamster	328	ASPHR	M	PL	E	FKTLNVLHNRGALKLTTGK	C	MKQ ₃₅₉	(Z46801)
ST8Sia IV Huhn	328	ASPHR	M	PL	E	FKTLNVLHNRGALKLTTGK	C	VKQ ₃₅	(AF008194)
ST8Sia V Human	345	PGGHA	M	PS	E	IFNFLHLHRSRILRVHTGT	C	SCC ₃₇₆	(U91641)
AA-Austausch in 2A10			V	K				F	

Abb. 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Sialyltransferasen im Bereich der Sialylmotive mit Hinblick auf die in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 mutierten Positionen. PST-Positionen, die in 2A10-Zellen mutiert und in anderen Sialyltransferasen identisch sind, wurden fett gedruckt. In Klammern sind die Zugangsnummern der Sequenzen in der Gen-Datenbank angegeben.

In Abb. 15 ist ein Sequenzvergleich verschiedener Sialyltransferasen mit Hinblick auf die in 2A10-Zellen mutierten Positionen gezeigt. Von den bisher bekannten α 2,8-Sialyltransferasen wurden diejenigen ausgewählt, deren Sequenz vollständig bekannt ist. Aus der Fülle der Sialyltransferasen anderer Spezifität, von denen zur Zeit mehr als 50 kloniert sind (komplette Liste im Anhang unter VI 3), wurden die Enzyme aus der Maus ausgewählt, da bei diesen die Homologie zur Hamster-PST am ausgeprägtesten ist. Bis auf die Position Methionin³³³ sind alle anderen durch 2A10-Mutationen betroffenen Aminosäuren in der Gruppe der α 2,8-Sialyltransferasen konserviert. Anstelle von Methionin³³³ ist in der ST8SialIII ein Leucin zu finden. Glycin¹⁴⁶, Glycin²⁸¹ und Glutaminsäure³³⁶ sind als Bestandteil eines Sialylmotives über die Spezifitätsgrenzen hinaus konserviert. Glycin²⁸¹ ist sogar in allen aufgeführten Sialyltransferasen vorhanden.

III 2 Charakterisierung der von 2A10-Mutationen abgeleiteten PST- und STX-Mutanten

III 2.1 Zielgerichtete Mutagenese zum Einfügen von 2A10-Mutationen in die Wildtypsequenzen von PST und STX

Um die physiologische Bedeutung der in III 1.4 beschriebenen Mutationen zu untersuchen, wurden identische Nukleotidaustausche in die Wildtypsequenz der PST eingefügt. Die Punktmutationen der beiden Doppelmутanten (9D8 und 2D8) wurden dabei separat behandelt. Den 2A10-Mutationen entsprechende Aminosäureaustausche wurden ebenfalls in die Wildtypsequenz der STX übertragen. Von allen Mutanten wurde zum einen eine Transmembranform, die aus der kompletten Aminosäuresequenz des entsprechenden Enzyms besteht, und zum anderen eine lösliche Form, die um den zytosolischen Bereich und die Transmembrandomäne (PST: Aminosäuren 1 bis 25; STX: Aminosäuren 1 bis 31) verkürzt ist, hergestellt. Um die Aufreinigung und Darstellung der Mutanten zu ermöglichen, wurden Fusionsproteine generiert. Die Transmembranformen enthalten einen N-terminalen FlagHA-Fusionsteil und die löslichen Formen weisen am C-Terminus eine MycHis-Epitopsequenz auf.

Zur Klonierung der Mutanten war es notwendig, zuerst die Wildtypsequenzen von Hamster-PST und Maus-STX in die entsprechenden Vektoren zu klonieren. Um die Expression der Transmembranformen in eukaryontischen Zellen zu ermöglichen, wurde pcDNA3 als Ausgangsvektor verwendet. Über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* wurde durch Hybridisierung und Ligation der Oligonukleotide FlagM5s und FlagM5as (Primer siehe II 1.5, Methode siehe II 2.1.10) die Flag-Epitopsequenz "MDYKDDDDK" (M ist das Start-Methionin) eingefügt. In den so entstandenen Vektor pFlagB1 wurde dann nach gleicher

Methode über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I mit den Oligonukleotiden HABgl2s und HANot1as die HA-Epitopsequenz "YPYDVPDYASL" eingebracht. In diesen Vektor (pFlagHA) wurde anschließend über die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I die gesamte kodierende Sequenz von PST bzw. STX, welche zuvor durch PCR mit den Vektoren pME7 bzw. pBS_mSTX als Matrize und den Primern MW5 und AB6 bzw. MW28 und MM32 amplifiziert worden war (II 2.1.13), eingefügt. Diese Plasmide wurden mit pFlagHA-PST und pFlagHA-STX bezeichnet. Für die Expression der löslichen Formen mit C-terminalem MycHis-Fusionsanteil wurde der Vektor pSecTag B verwendet. Die verkürzten Sequenzen der Hamster-PST (Nukleotide 76 bis 1077) bzw. Maus-STX (Nukleotide 94 bis 1125) wurden durch PCR mit pME7 bzw. pBS_mSTX als Matrize und den Primerpaaren MM26/MM31 bzw. MM29/MM30 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in pSecTag B eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden pPST-MycHis und pSTX-MycHis genannt. In Abb. 16 sind die von den Plasmiden pFlagHA-PST, pFlagHA-STX, pPST-MycHis und pSTX-MycHis kodierten Wildtypenzyme schematisch dargestellt.

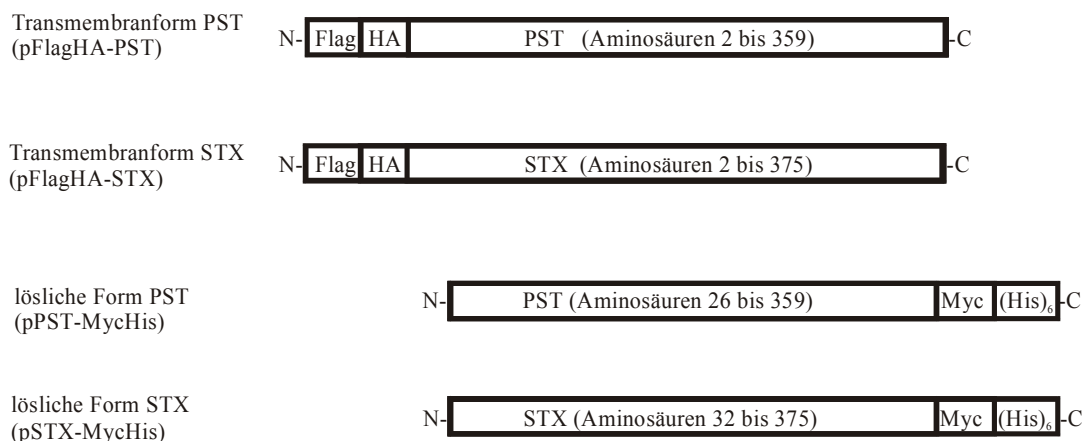


Abb. 16: Schematische Darstellung der membranständigen und löslichen Fusionsproteine von PST und STX.

Für die zielgerichtete Mutagenese der Wildtypsequenzen wurden drei Strategien angewendet. In vielen Fällen war es möglich, den mutierten Bereich entweder aus der durch RT-PCR amplifizierten und klonierten cDNA oder aus einer bereits vorhandenen Mutante direkt durch Restriktionsspaltung herauszuschneiden und in den geeigneten Wildtypvektor zu klonieren. Diese Strategie wurde zur Generierung folgender Plasmide angewendet (zur Namensgebung der Plasmide siehe II 1.6):

Plasmid	Ursprungs-DNA	Restriktionsenzyme
pPST/G146E	4C4-cDNA	<i>Esp3I/BamHI</i>
pPST/T189I	7G11-cDNA	<i>Esp3I/BamHI</i>
pPST/V230A/R277G	9D8-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pPST/G281S	5C3-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pPST/M333V	2D8-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pTM-PST/G146E	4C4-cDNA	<i>Esp3I/BamHI</i>
pTM-PST/T189I	7G11-cDNA	<i>Esp3I/BamHI</i>
pTM-PST/V230A/R277G	9D8-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pTM-PST/R277G	pPST/R277G	<i>BamHI/EcoRI</i>
pTM-PST/G281S	5C3-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pTM-PST/M333V	2D8-cDNA	<i>BamHI/EcoRI</i>
pTM-STX/G161E	pSTX/G161E	<i>EcoRI</i>
pTM-STX/T204I	pSTX/T204I	<i>EcoRI</i>
pTM-STX/R292G	pSTX/T204I	<i>EcoRI</i>
pTM-STX/G296S	pSTX/G296S	<i>EcoRI</i>
pTM-STX/M348V	pSTX/M348V	<i>EcoRI</i>

Tab. 5: 2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch Umklonierung generiert wurden. Angegeben sind die Ursprungs-DNA und die verwendeten Restriktionsenzyme.

Folgende Mutanten, für die eine Umklonierung des mutierten Bereiches nicht möglich war, wurden durch Fusions-PCR (II 2.1.14) generiert:

Plasmid	1. PCR	2. PCR	Restriktionsenzyme
pPST/V230A	MA22/MM17	MA23/ME17	<i>BamHI/EcoRI</i>
pPST/R277G	MA29/MM17	MA21/ME17	<i>BamHI/EcoRI</i>
pPST/E336K	MW30/MA26	MW31/ME25	<i>BamHI/XbaI</i>
pPST/C356F	MA24/MA26	MA25/ME25	<i>BamHI/XbaI</i>
pSTX/G161E	MA16/MM30	MA17/MA11	<i>HindIII/PstI</i>
pSTX/T204I	MW20/CB15	MW21/KB9	<i>HindIII/PstI</i>
pSTX/R292G	MW22/MM30	MW23/MA11	<i>BamHI/XbaI</i>
pSTX/G296S	MA18/MM30	MA19/MA11	<i>BamHI/XbaI</i>
pSTX/M348V	MW24/BGH	MW25/CB34	<i>BamHI/XbaI</i>
pSTX/E351K	MW32/MA26	MW33/CB34	<i>BamHI/XbaI</i>
pSTX/C371F	MW26/BGH	MW27/CB34	<i>BamHI/XbaI</i>

Tab. 6: 2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch Fusions-PCR generiert wurden. Angegeben sind die Primer, die in der 1. und 2. PCR verwendet wurden, sowie die benutzten Restriktionsenzyme.

Bei der dritten Gruppe von Plasmiden handelt es sich um Transmembrankonstrukte, die aufgrund der Lage der Mutation am C-Terminus nicht durch Umklonierung aus den löslichen Mutanten hergestellt werden konnten. Es wurde daher eine PCR mit dem löslichen Konstrukt als Matrize und Primern, über die das Stop-Kodon eingefügt wurde, durchgeführt.

Plasmid	PCR	Restriktionsenzyme
pTM-PST/E336K	ME25/MM24	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pTM-PST/C356F	ME25/MM24	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pTM-STX/E351K	MM32/CB34	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pTM-STX/C371F	MM32/CB34	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I

Tab. 7: 2A10-Mutanten kodierende Plasmide, die durch PCR generiert wurden. Angegeben sind die verwendeten Primer sowie die Restriktionsenzyme.

Für alle Mutanten wurde entweder der gesamte eingefügte Bereich, wenn dieser zuvor über PCR amplifiziert worden war, oder bei direkter Umklonierung nur der Bereich um die Restriktionsschnittstellen und um die Mutation durch Sequenzierung (II 2.1.15) überprüft.

III 2.2 Expression in 2A10-Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob alle Mutanten in eukaryontischen Zellen exprimiert werden können. Diese Untersuchung sollte zudem erste Einsichten über die Auswirkungen der Mutationen auf die Integrität und Stabilität der Proteine geben. Dazu wurden die Transmembranformen der PST- und STX-Mutanten in 2A10-Zellen (Subklon 2A10) transfiziert (II 2.2.8.1), anschließend aus den Zelllysaten über den anti-HA-Antikörper 12CA5 immunpräzipitiert (II 2.3.7) und im Western Blot mit dem anti-Flag-Antikörper M5 detektiert (II 2.3.4). Um zusätzlich erste Aussagen über die Funktionalität der Mutanten machen zu können, wurden die Zelllysate im Western Blot durch Entwicklung mit dem anti-PSA-Antikörper 735 auf PSA-Expression untersucht. Die gleichzeitige Entwicklung mit dem anti-NCAM-Antikörper KD11 ermöglichte den Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge. Als Positivkontrolle wurde der Wildtyp (pFlagHA-PST bzw. pFlagHA-STX) und als Negativkontrolle der leere Vektor (pFlagHA) transfiziert und parallel analysiert.

In Abb. 17 und Abb. 18 sind die Ergebnisse für alle PST- und STX-Mutanten aufgeführt. Es wird eindeutig gezeigt (B), dass alle Mutanten von 2A10-Zellen synthetisiert wurden, wenngleich die Expressionshöhen geringfügig unterschiedlich waren. Diese Unterschiede waren nicht von der Mutation abhängig, was wiederholte Experimente gezeigt haben, sondern können durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen erklärt werden. Das Auftreten von Doppelbanden bei PST bzw. Dreifachbanden bei STX ist durch nicht vollständig glykosylierte Vorstufen der Enzyme, die das Endoplasmatische Retikulum noch nicht passiert haben, zu erklären. Die in Abb. 18B auftretende Bande bei 45 kDa ist auf STX ohne N-Glykanstrukturen zurückzuführen. Abb. 17A und Abb. 18A verdeutlichen, dass nur die Wildtypenzyme (wt) in der Lage sind, den PST-Defekt von 2A10-Zellen zu komplementieren.

Interessanterweise konnte auch für die Mutante TM-PST/R277G ein PSA-Signal nachgewiesen werden, das jedoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich schwächer ausfiel. Der Unterschied in den Signalintensitäten beruhte dabei nicht auf unterschiedlichen Proteinmengen, wie der Vergleich der NCAM-Banden bei 140 und 180 kDa zeigt. Die übrigen 2A10-Mutationen führten sowohl in der PST als auch in der STX zu einem kompletten Funktionsverlust der Mutanten auf zellulärer Ebene.

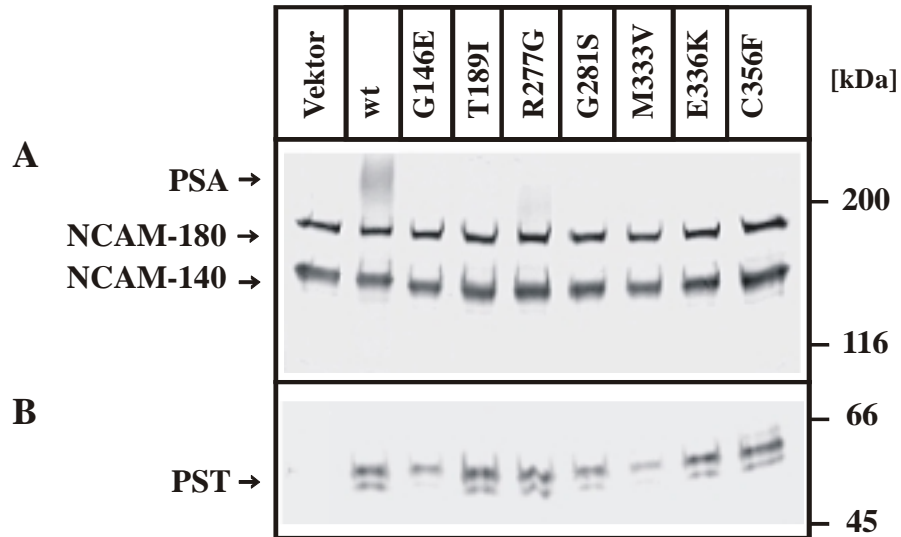


Abb. 17: Expression der TM-PST-Mutanten in 2A10-Zellen. A) Nachweis von PSA und NCAM im Zelllysat B) Proteinnachweis im Zelllysat.

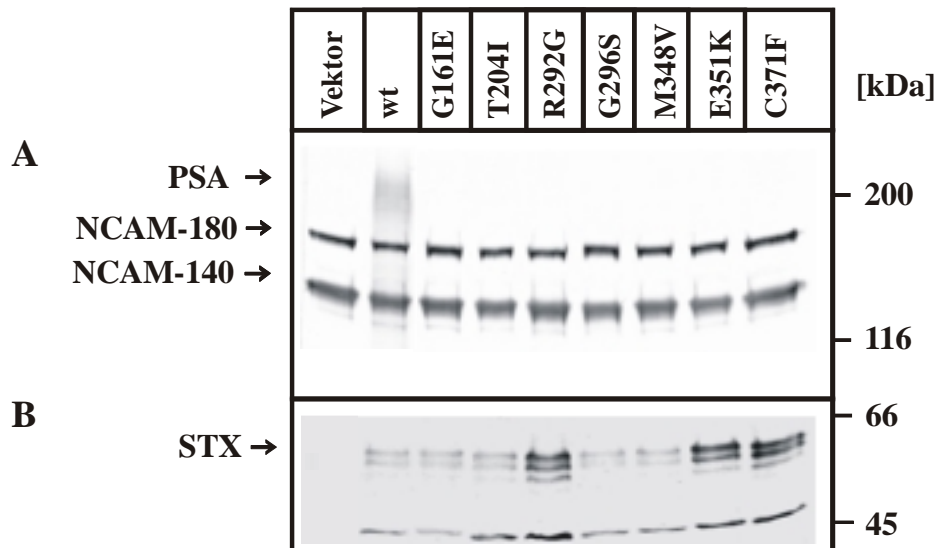


Abb. 18: Expression der TM-STX-Mutanten in 2A10-Zellen. A) Nachweis von PSA und NCAM im Zelllysat B) Proteinnachweis im Zelllysat.

III 2.3 Test auf *in vitro*-Aktivität

Zur Untersuchung der *in vitro*-Aktivität der Mutanten wurden die löslichen Formen in 2A10-Zellen transient transfiziert (II 2.2.8.1) und durch Immunpräzipitation mit dem anti-Myc-Antikörper 9E10 aus dem Zellkulturüberstand isoliert (II 2.3.7). Für einen Reaktionsansatz, der einer Spur im Gel entspricht, wurden bis zu 6 ml Zellkulturüberstand nacheinander in Aliquots à 1,5 ml extrahiert. Im Test auf NCAM-Polysialylierung wurde zusätzlich zur Polysialyltransferase ein ProteinA-NCAM-Fusionsprotein an die Gelmatrix angelagert. Die Polysialylierung wurde durch Zugabe von [¹⁴C]-markierter CMP-Neu5Ac gestartet. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Reaktion gestoppt und die Proben im SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Exposition der getrockneten Gele auf einem Röntgenfilm führte zur Darstellung der radioaktiv markierten PSA, die entweder an NCAM oder an das Enzym selbst gebunden vorlag. Die Spezifität dieses Signals wurde durch einen parallelen Ansatz, der nach Inkubation mit dem radioaktiven Substrat mit Endo NE versetzt wurde, sichergestellt (siehe II 2.3.8). Die genauere Durchführung des *in vitro*-Aktivitätstests ist unter II 2.3.15 beschrieben und in Abb. 7 schematisch dargestellt. Parallel wurde die Proteinexpression im Zellkulturüberstand und im Zelllysat der transfizierten Zellen kontrolliert. Dazu wurden die rekombinanten Proteine mit 9E10-gekoppelter Sepharose zum einen aus dem gleichen Volumen an Zellkulturüberstand, das auch für die radioaktiven Proben eingesetzt wurde, und zum anderen aus dem Zelllysat der transfizierten 2A10-Zellen immunpräzipitiert. Das auf diese Weise angereicherte Enzym wurde anschließend im Western Blot mit 9E10 detektiert. Zusätzlich wurde das Zelllysat im Western Blot mit 735 und KD11 auf PSA- und NCAM-Expression überprüft. Alle Mutanten wurde mindestens zweimal in unabhängigen Experimenten getestet. Die Ergebnisse für sämtliche PST-Varianten sind in Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21, die für alle STX-Mutanten in Abb. 22 und Abb. 23 aufgeführt.

Für Wildtyp-PST kann man in allen Experimenten die charakteristischen PSA-Signale, die sich für das autopolysialylierte Enzym über einen Molekulargewichtsbereich von 60 bis 300 kDa erstrecken, erkennen (A). Die Heterogenität des Signals beruht dabei auf PSA-Ketten mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad. Im Test auf NCAM-Polysialylierung lassen sich nach dem spezifischen Abbau der PSA durch die Endoneuraminidase NE die Banden für das ProteinA-NCAM-Fusionsprotein bei ca. 150 kDa und die für die Polysialyltransferase bei ca. 60 kDa eindeutig zuordnen (B,+). Das Signal in der Autoradiographie beruht auf den fünf radioaktiven Sialinsäuren, die von der Endo NE nicht abgespalten werden.

Das PSA-Signal in der unverdauten Probe (B,-) stellt demnach eine Überlagerung von NCAM- und Autopolysialylierung dar.

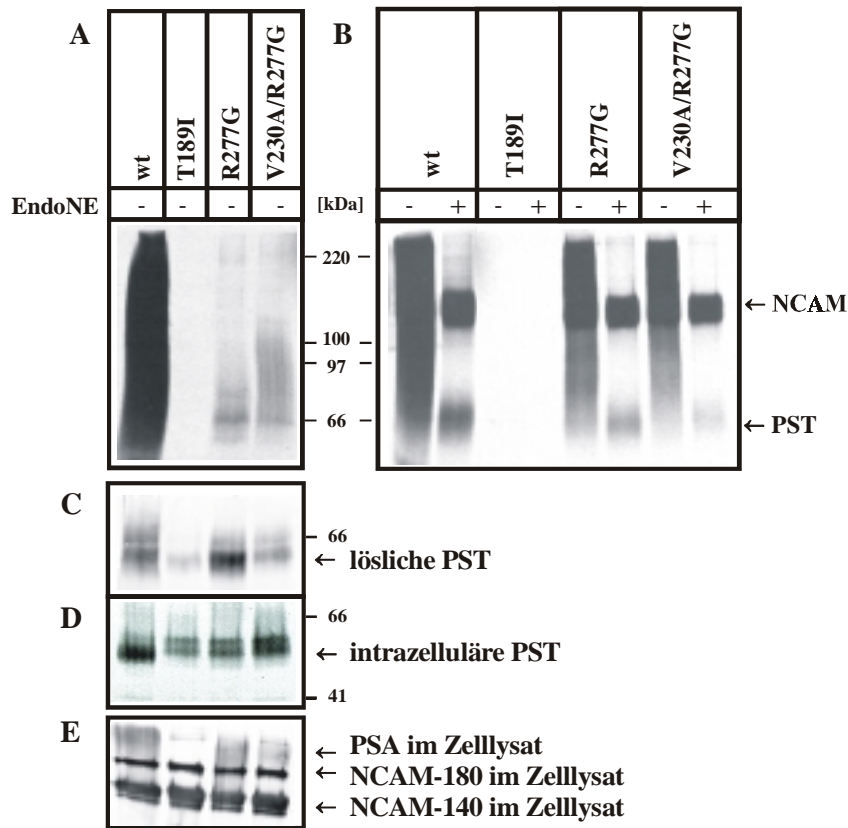


Abb. 19: *In vitro*-Aktivitätstest von PST/T189I, PST/R277G und PST/V230A/R277G. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysate E) PSA-Nachweis im Zelllysate.

Abb. 19A und B kann man entnehmen, dass die Mutante PST/T189I im Gegensatz zum Wildtyp keinerlei Aktivität bezüglich Auto- und NCAM-Polysialylierung besitzt. Entsprechend ließ sich auch in den Zelllysaten keine PSA nachweisen (E), obwohl zum Wildtyp äquivalente Mengen an Protein aufgetragen wurden, wie der Vergleich der Intensität der NCAM-Banden zeigt. Intrazellulär wurde die Mutante auf Wildtypniveau exprimiert (D). Die Sekretion von PST/T189I in den Zellkulturüberstand war nur in diesem Versuch gegenüber dem Wildtyp etwas vermindert. In anderen Experimenten, die identische Resultate bezüglich der Aktivität lieferten, befand sie sich auf Wildtypniveau.

Die Mutante PST/R277G zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine erheblich verringerte Aktivität, sich zu autopolysialylieren (Abb. 19A). Die Polysialylierung von NCAM unterschied sich dagegen nicht vom Wildtyp (B,-). Vergleicht man im Test auf NCAM-Polysialylierung die Signale für PST nach Endo NE-Verdau (B,+ - Banden bei ca. 60 kDa), so sind die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante längst nicht mehr so deutlich, wie im

Test auf Autopolysialylierung in Abwesenheit von NCAM (A). Wie das PSA-Signal im Western Blot des Zelllysates zeigt, ist die Kapazität von PST/R277G, in der Zelle PSA zu synthetisieren, gegenüber dem Wildtyp beeinträchtigt (E). Die Mutante PST/V230A/R277G verhielt sich genau wie die zuvor beschriebene Mutante PST/R277G. Daraus ergibt sich, dass die Mutation Valin²³⁰→Alanin keine Auswirkung auf die Enzymaktivität hat. Der *in vitro*-Aktivitätstest für die Mutante PST/V230A, der hier nicht gezeigt wird, bestätigte diese Beobachtung. PST/V230A verhielt sich in allen Tests wie das Wildtypenzym. Die Mutation Valin²³⁰→Alanin wurde deswegen im weiteren Verlauf der Analyse nicht berücksichtigt.

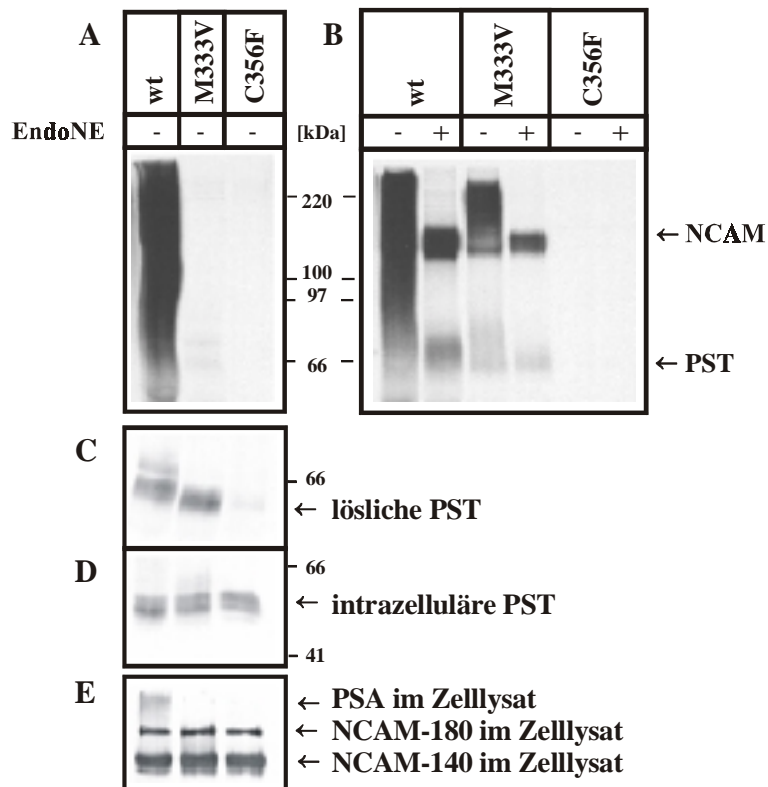


Abb. 20: *In vitro*-Aktivitätstest von PST/M333V und PST/C356F. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysate E) PSA-Nachweis im Zelllysate.

Wie Abb. 20 verdeutlicht, hatte die Mutation Methionin³³³→Valin *in vitro* den gleichen Effekt auf die PST-Aktivität, wie die zuvor beschriebene Mutation Arginin²⁷⁷→Glycin. Auch hier ist Polysialylierung nur in Anwesenheit von NCAM zu beobachten. Die Fähigkeit, NCAM und sich selbst zu polysialylieren, war jedoch deutlicher als bei PST/R277G gegenüber dem Wildtyp reduziert (A und B). Im Gegensatz zu PST/R277G hatte PST/M333V zudem das Potential, in der Zelle PSA zu synthetisieren, komplett eingebüßt (E).

PST mit der Mutation Cystein³⁵⁶→Phenylalanin besitzt keine enzymatische Aktivität. Hier muss allerdings erwähnt werden, dass die Sekretion dieser Mutante ins Zellkulturmedium

deutlich reduziert war, obwohl intrazellulär dem Wildtyp entsprechende Proteinmengen detektiert wurden (C und D). Abb. 21 zeigt die Ergebnisse des *in vitro*-Tests für die Mutanten PST/G146E, PST/G281S und PST/E336K. Alle Mutanten haben ihre Enzymaktivität komplett verloren (A, B, und E), obwohl die Untersuchungen zur Proteinexpression beweisen, dass die Synthese und Sekretion dieser Mutanten normal verläuft (C und D).

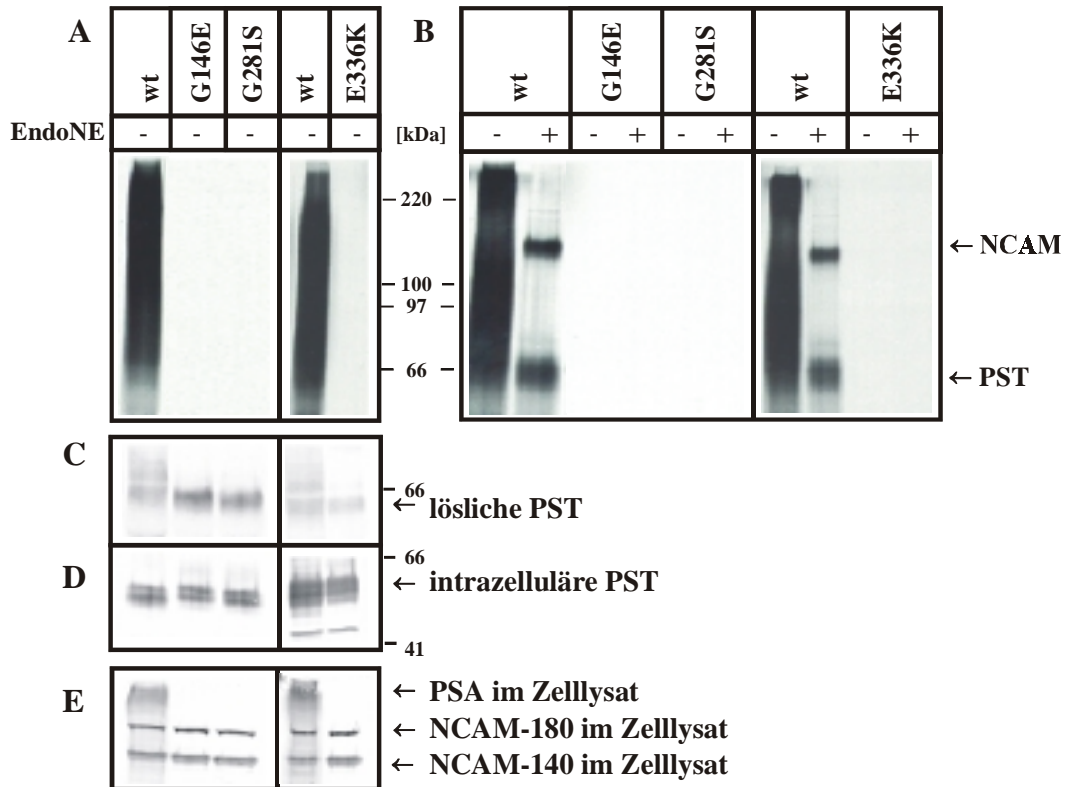


Abb. 21: *In vitro*-Aktivitätstest von PST/G146E, PST/G281S und PST/E336K. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysate E) PSA-Nachweis im Zelllysate.

In Abb. 22 und Abb. 23 sind die Ergebnisse des *in vitro*-Tests für alle STX-Mutanten aufgeführt. STX synthetisierte im Vergleich zur PST kürzere PSA-Ketten, wie man z.B. Abb. 22A und B entnehmen kann. NCAM- und Autopolysialylierung, die bei PST nicht zu dissoziieren sind, lassen sich für STX deutlich unterscheiden (B, -). Die Addition von Sialinsäure führte bei STX zu einem Molekulargewichtszuwachs von 30 bis 50 kDa; bei PST konnte dieser dagegen bis zu 150 kDa betragen. Ein weiterer Unterschied zwischen PST und STX liegt im Expressionsverhalten. STX und die davon abgeleiteten Mutanten wurden im allgemeinen besser von 2A10-Zellen exprimiert (C). Zudem waren die Schwankungen in der Expressionshöhe für die Wildtypenzyme und die Mutanten bei PST größer als bei STX. Intrazellulär konnte man für STX neben der unglykosylierten Form bei ca. 45 kDa bis zu fünf weitere Banden zwischen 50 und 60 kDa nachweisen (D). Diese Banden beruhen auf partiell

nicht glykosylierten sich noch im Reifungsprozess befindenden Formen der STX. Bei PST kann man neben der unglykosylierten Form bei ca. 41 kDa, die auch nicht immer nachzuweisen war, nur zwei bis drei weitere Banden im Bereich um die 50 kDa zuordnen (siehe z.B. Abb. 19D).

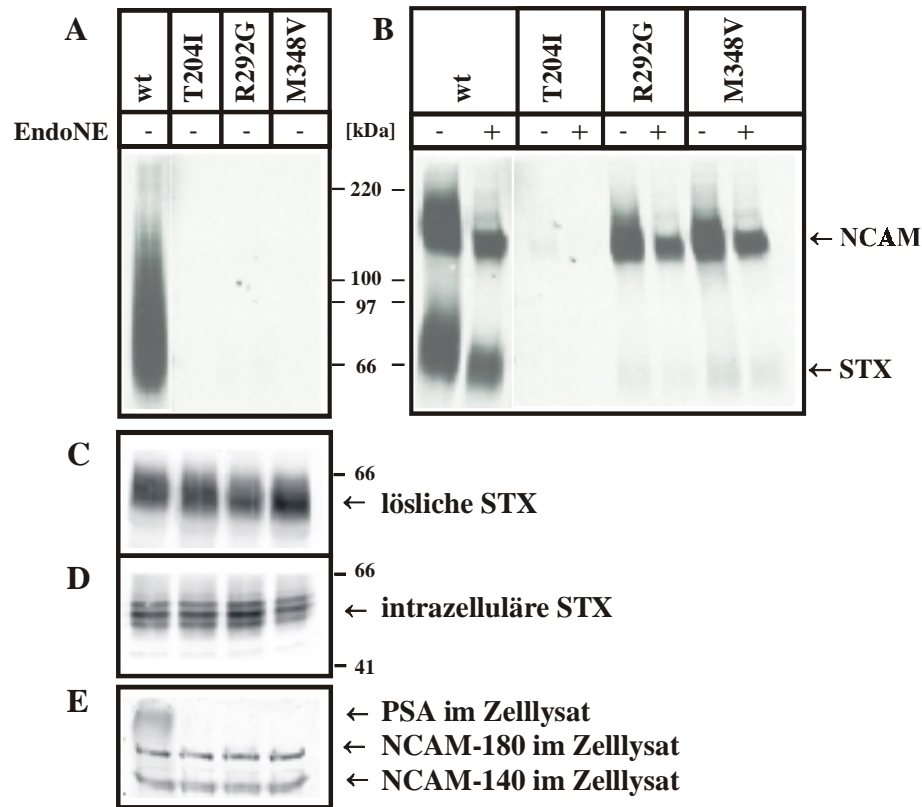


Abb. 22: *In vitro*-Aktivitätstest von STX/T204I, STX/R292G und STX/M348V. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysate E) PSA-Nachweis im Zelllysate.

Die in Abb. 22 und Abb. 23 dargestellten Aktivitätstests für die STX-Mutanten T204I, R292G und M348V sowie G161E, G296S, E351K und C371F verdeutlichen, dass der Austausch dieser Aminosäuren in der STX nahezu identische Effekte hervorruft wie in der PST. Bis auf die Mutanten STX/R292G und STX/M348V haben alle STX-Varianten ihre Aktivität vollständig eingebüßt. STX/C371F zeigte jedoch im Gegensatz zur PST-Mutante keine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Sekretion in den Zellkulturüberstand (Abb. 23C). Für diese Mutante liegt somit der eindeutige Beweis vor, dass sie keine enzymatische Aktivität besitzt. Die Mutanten STX/R292G und STX/M348V, welche identische Aktivitätsprofile besitzen, weisen in Übereinstimmung mit den PST-Varianten einen selektiven und nahezu vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Autopolysialylierung auf. Sie zeigten dabei jedoch im Gegensatz zu den PST-Mutanten, bei denen noch ein sehr schwaches Signal zu erkennen war, überhaupt keinen Einbau radioaktiver Sialinsäure (Vergleich: Abb. 19A und Abb. 20A zu

Abb. 22A). In Gegenwart von NCAM erhielten auch die STX-Mutanten diese Fähigkeit in geringem Umfang zurück (Abb. 22B). Da jedoch schon der STX-Wildtyp in Bezug auf Autopolysialylierung weniger aktiv ist als PST, fielen diese Signale für die STX-Mutanten ebenfalls deutlich schwächer als für PST aus. Die Mutanten von PST und STX unterschieden sich auch bezüglich ihrer Fähigkeit, in transfizierten Zellen PSA zu synthetisieren. PST/R277G war dazu noch in der Lage, wenn auch vermindert, STX/R292G dagegen nicht (Vergleich: Abb. 19E zu Abb. 22E). Dieser Unterschied war zuvor schon in der Analyse der Transmembranformen deutlich geworden (siehe III 2.2).

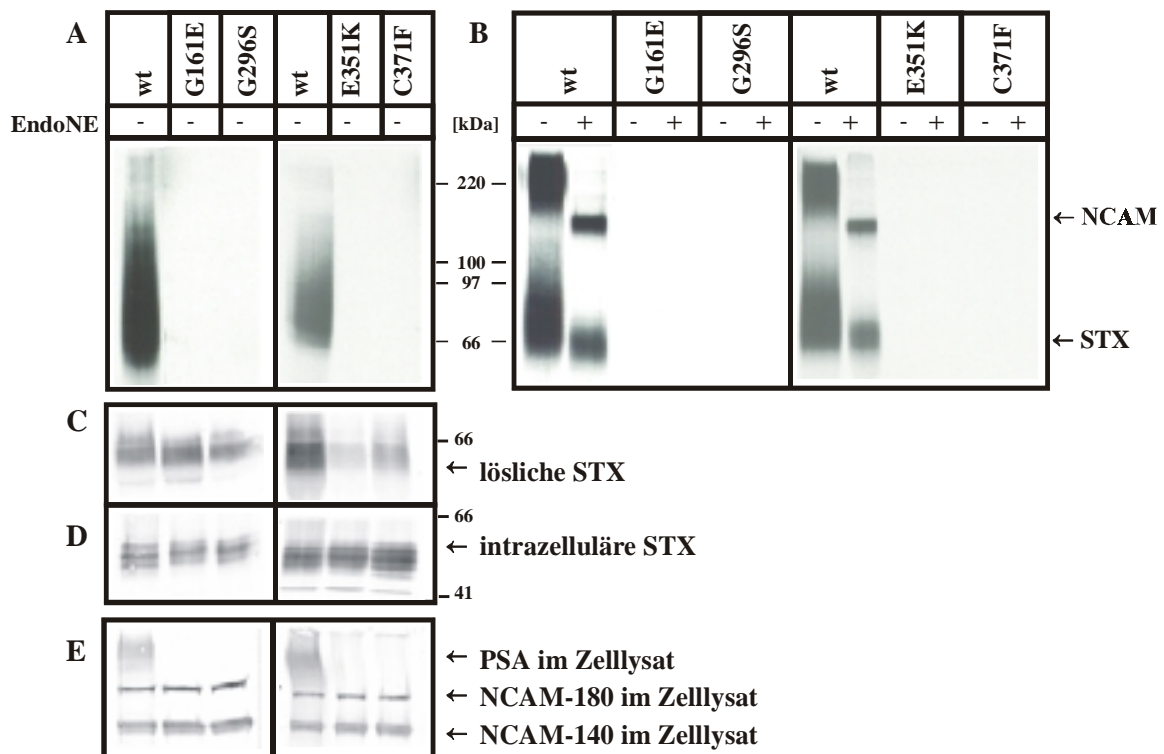


Abb. 23: *In vitro*-Aktivitätstest von STX/G161E und STX/G296S sowie von STX/E351K und STX/C371F. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysat E) PSA-Nachweis im Zelllysat.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Aktivitätstests für alle von 2A10-Mutationen abgeleiteten PST- und STX-Mutanten zusammengefasst. Es hat sich gezeigt, dass alle Mutationen in der PST-cDNA, die durch RT-PCR in Klonen der Komplementationsgruppe 2A10 identifiziert worden waren, einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität des resultierenden Proteins besitzen. Die einzige Ausnahme bildet der Klon 9D8, der neben der Mutation Arginin²⁷⁷→Glycin, die massgeblich die Aktivität beeinträchtigt, eine weitere Mutation Valin²³⁰→Alanin aufweist, die sich nicht auf die Enzymaktivität auswirkt. Es war also ein 2A10-Klon selektioniert worden, der durch Zufall eine zusätzliche Mutation, die alleine nicht

zur Selektion geführt hätte, enthält. Eine Besonderheit bildet auch der Klon 2D8, bei dem zwei essentielle Aminosäuren betroffen sind. Der Austausch einer dieser Aminosäuren hätte schon zur Selektion dieses Klons ausgereicht. Mit Hinblick auf die Aktivitätsprofile der Mutanten kann man zusammenfassend sagen, dass bis auf die zwei Mutationen Arginin²⁷⁷→Glycin und Methionin³³³→Valin, deren Mutanten noch in der Lage waren, *in vitro* in Gegenwart von NCAM zu polysialylieren, alle anderen zu einem komplett inaktivierten Enzym führen.

PST- bzw. STX-Mutante	Auto-polysialylierung (<i>in vitro</i>)	Auto-polysialylierung (<i>in vitro</i> , mit NCAM)	NCAM-Polysialylierung (<i>in vitro</i>)	NCAM-Polysialylierung (in transfizierten Zellen)
wt	+++	+++	+++	+++
wt	++	++	++	+++
T189I	-	-	-	-
T204I	-	-	-	-
G146E	-	-	-	-
G161E	-	-	-	-
V230A	+++	+++	+++	+++
V230A/R277G	(+)	+	+++	++
R277G	(+)	+	+++	++
R292G	-	(+)	++	-
G281S	-	-	-	-
G296S	-	-	-	-
M333V	(+)	+	+++	-
M348V	-	(+)	++	-
E336K	-	-	-	-
E351K	-	-	-	-
C356F	-	-	-	-
C371F	-	-	-	-

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der *in vitro*-Aktivitäten aller PST- und STX-Varianten mit 2A10-Mutationen: Skala von +++: maximales Signal bis (+): sehr schwaches Signal, -: kein Signal

III 2.4 Intrazelluläre Lokalisation

Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation der PST- und STX-Mutanten im Vergleich zu den Wildtypenzymen wurden die entsprechenden Transmembranformen in NIH 3T3-Zellen transient transfiziert. Die Transfektion wurde entweder mit SuperFect (II 2.2.8.2) oder Effectene (II 2.2.8.3) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass Effectene die Zellen weniger schädigt, weswegen es bevorzugt eingesetzt wurde. Die Zellen wurden direkt auf Deckgläschen ausgesät, transfiziert, einen Tag später mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Zur Darstellung der Flag-Epitope wurde der Antikörper M5 und zur gleichzeitigen Anfärbung des Golgi-Apparates [173] ein α -MannosidaseII-Antiserum

eingesetzt (II 2.2.11). Die sekundären Antikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen DTAF bzw. TRITC gekoppelt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen für die PST-Mutanten sind in Abb. 24 aufgeführt.

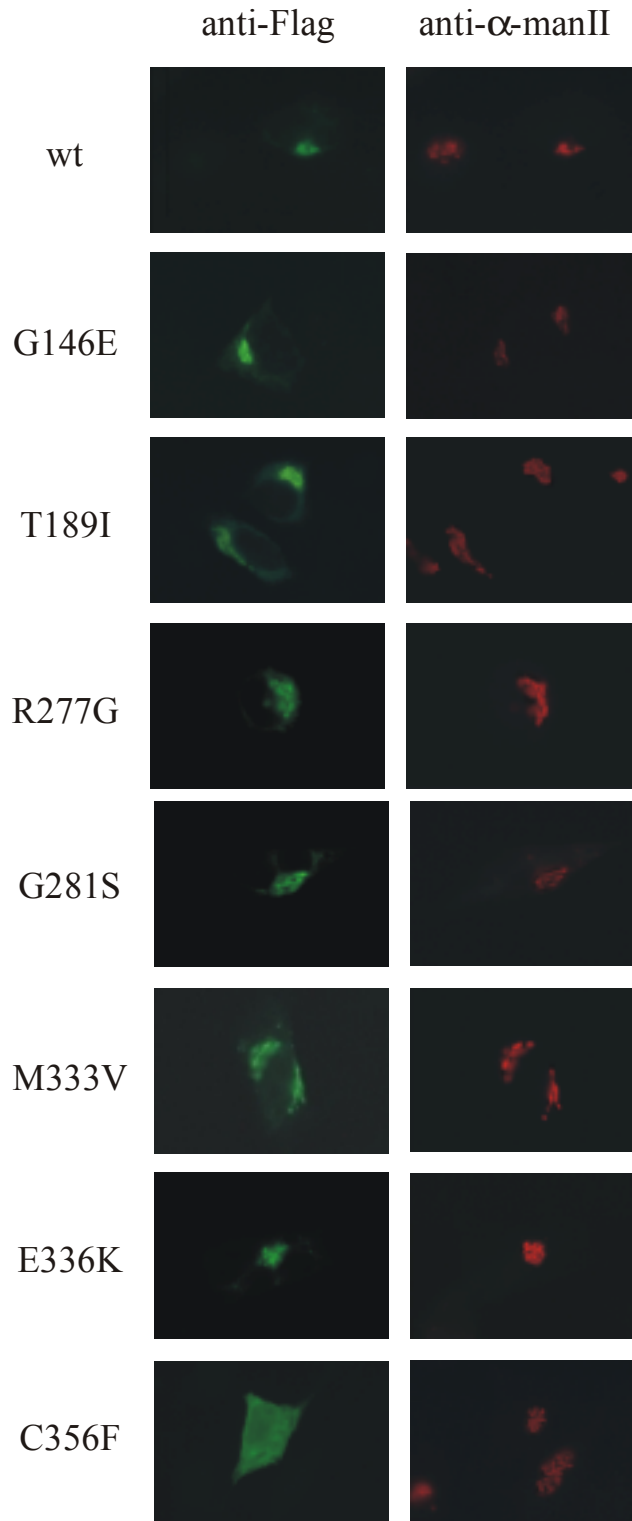


Abb. 24: Intrazelluläre Lokalisation der PST-Mutanten. Doppelfärbung der transient transfizierten NIH 3T3-Zellen mit dem anti-Flag-Antikörper M5 zur Darstellung der rekombinanten Proteine (linke Spalte) und einem Antiserum gegen α -MannosidaseII als Golgi-Marker (rechte Spalte).

Abb. 24 zeigt deutlich, dass alle Mutanten mit Ausnahme von PST/C356F eine dem Wildtyp entsprechende Lokalisation aufweisen. Die räumliche Übereinstimmung ("Ko-Lokalisation") der Fluoreszenzsignale, die zum einen von den FlagHA-Fusionsproteinen (grüne Signale, linke Spalte) und zum anderen vom Golgi-residenten Enzym α -MannosidaseII verursacht wurden (rote Signale, rechte Spalte), beweist zudem, dass beide Proteine in der Zelle im gleichen Kompartiment, dem Golgi-Apparat, vorliegen. Eine Ko-Lokalisation konnte nur für die Mutante PST/C356F nicht nachgewiesen werden. Dieses FlagHA-Fusionsprotein war nicht wie die anderen nur im Golgi, sondern auch in anderen Kompartimenten vorhanden. Um den Aufenthaltsort dieser Cysteinmutante in der Zelle genauer zu bestimmen, wurde sie im Vergleich zum Wildtyp mit einem Antiserum gegen Calnexin, einem Markerprotein für das Endoplasmatische Retikulum, in der Immunfluoreszenz analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 25 dargestellt. Die Signale für die PST-Mutante C356F stimmen mit denen für Calnexin überein, wohingegen der Wildtyp keine Ko-Lokalisation zeigt. Die Tatsache, dass PST/C356F nicht korrekt in den Golgi-Apparat transportiert, sondern im ER zurückgehalten wurde, erklärt auch, dass die lösliche Form dieser Mutante nicht, oder nur sehr schlecht, von transfizierten Zellen sekretiert wurde (siehe III 2.3, Abb. 20C).

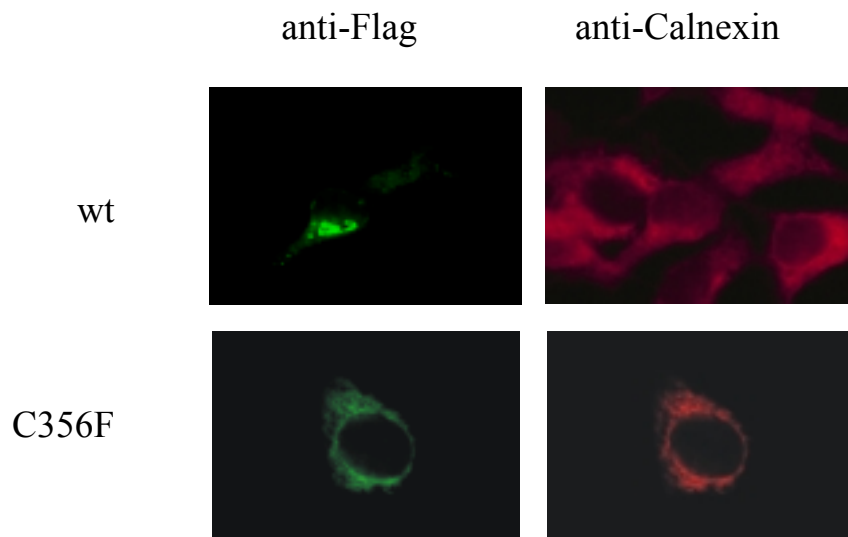


Abb. 25: Intrazelluläre Lokalisation der Mutante PST/C356F. Doppelfärbung der transient transfizierten NIH 3T3-Zellen mit dem anti-Flag-Antikörper M5 zur Darstellung der rekombinanten Proteine (linke Spalte) und einem Antiserum gegen Calnexin als ER-Marker (rechte Spalte).

Für STX gestalteten sich diese Experimente schwieriger als für PST, da die Golgi-Lokalisation auch für den Wildtyp nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Nur sehr wenige transfizierte Zellen exprimierten STX in so geringen Mengen, dass selektiv nur der Golgi-Apparat angefärbt wurde. Sehr häufig konnte das FlagHA-STX-Fusionsprotein auch in anderen Kompartimenten nachgewiesen werden. Die Gegenfärbung mit dem Calnexin-Antiserum identifizierte diese Struktur eindeutig als Endoplasmatisches Retikulum. Weiterhin bestätigte eine Färbung mit den anti-STX-Antikörpern 3167, 3169 und 3187, die an den N-Terminus, den zentralen Bereich bzw. den C-Terminus der STX binden, dass es sich um eine spezifische Anfärbung der im ER lokalisierten vollständigen STX handelte, und dass keineswegs nur Bruchstücke des Proteins für die Anfärbung im ER verantwortlich waren. Auch für PST konnten transfizierte Zellen, die sehr viele Plasmidkopien aufgenommen hatten und daher das FlagHA-PST-Fusionsprotein überexprimierten, nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Zellen, für die eindeutig nur Golgi-Lokalisation der Polysialyltransferase gezeigt werden konnte, zu überexprimierenden Zellen, bei denen neben dem Golgi-Apparat auch das ER angefärbt wurde, war für PST jedoch erheblich größer als für STX. Dieses Phänomen geht einher mit den schon unter III 2.3 gemachten Beobachtungen, dass STX in löslicher Form besser exprimiert wurde als PST. Eine Reduktion der Menge an transfizierter STX-DNA auf bis zu ein Viertel der Ausgangsmenge oder eine Verringerung der Menge an Transfektionsreagenz bewirkte allerdings keine Verminderung der Überexpression, sondern ab einem Schwellenwert von ca. der Hälfte der Ausgangsmengen (DNA sowie Reagenz) ein drastisches Absinken der Transfektionseffizienz. Die Transfektion des löslichen STX-Konstruktes (pSTX-MycHis) führte im Vergleich zur Transmembranform zu einer deutlicheren Golgi-Färbung, was dadurch erklärt werden kann, dass es aufgrund der Sekretion nicht zu einem Rückstau des überexprimierten Proteins im ER kommen konnte. Insgesamt wurde aber auch für die STX-Mutanten eine mit dem Wildtyp übereinstimmende Lokalisation nachgewiesen. Aus den oben genannten Gründen konnte somit für STX/C371F im Gegensatz zur PST-Mutante keine eindeutig vom Wildtyp abweichende Lokalisation gezeigt werden. In Abb. 26 sind die Ergebnisse für die Mutanten STX/R292G und STX/M348V im Vergleich zum Wildtyp aufgeführt. Dabei ist jeweils eine Zelle mit fast ausschließlicher Golgi-Färbung und eine Zelle, bei der das ER schwach mitangefärbt wurde, dargestellt.

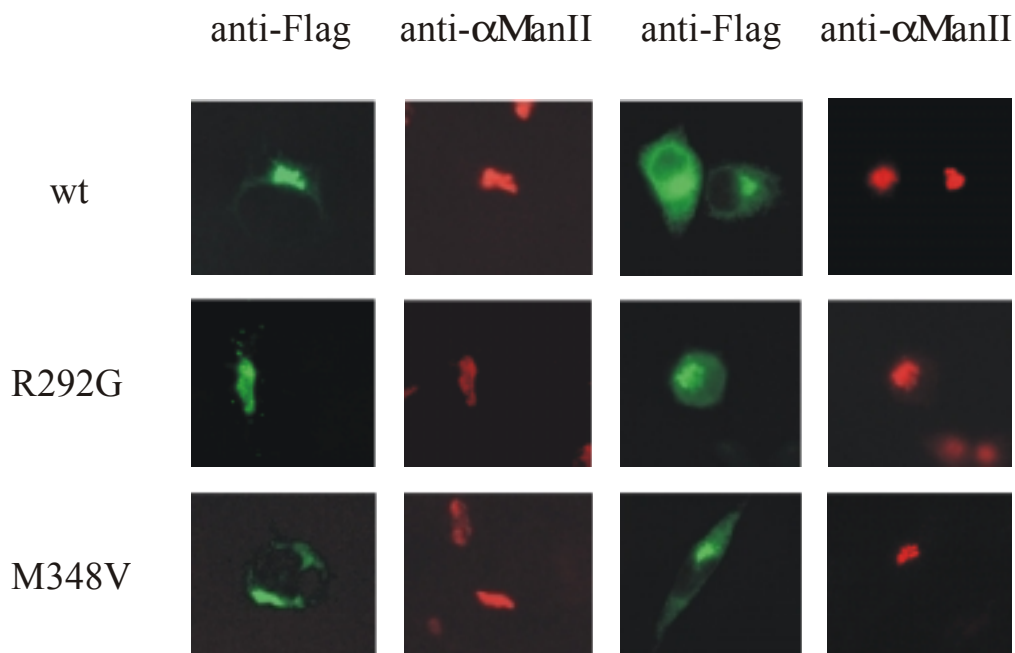


Abb. 26: Intrazelluläre Lokalisation der Mutanten STX/R292G und STX/M348V. Doppelfärbung der transient transfizierten NIH 3T3-Zellen mit dem anti-Flag-Antikörper M5 zur Darstellung der rekombinanten Proteine (Spalten 1 und 3) und einem Antiserum gegen α -MannosidaseII als Golgi-Marker (Spalten 2 und 4). In den Spalten 3 und 4 ist jeweils eine Zelle, die das FlagHA-STX-Fusionsprotein überexprimiert, dargestellt.

III 2.5 Weiterführende Charakterisierung der Mutanten PST/R277G und PST/M333V

Da sich die Mutationen Arginin²⁷⁷→Glycin und Methionin³³³→Valin durch die Fähigkeit ihrer Mutanten, *in vitro* NCAM zu polysialylieren und in Gegenwart von NCAM auch partiell zu autopolsialylieren, von den anderen 2A10-Mutationen abheben, wurden diese Mutanten eingehender analysiert.

III 2.5.1 Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in 2A10-Zellen

Da die Mutante TM-PST/R277G in der Lage ist, nach Transfektion in 2A10-Zellen zur Re-Expression von PSA zu führen, wenngleich diese im Vergleich zum Wildtyp schwächer ausfällt, wurde nun untersucht, ob die PSA-Expression von der Menge an transfizierter DNA abhängig ist. Weiterhin musste überprüft werden, ob durch eine Erhöhung der Menge an TM-PST/M333V-DNA im Transfektionsansatz auch für diese Mutante auf den Zelloberflächen PSA nachgewiesen werden kann. Die zur Transfektion in 2A10-Zellen eingesetzten Mengen an Plasmid-DNA (pFlagHA-PST, pTM-PST/R277G und pTM-PST/M333V) wurden bis zum

16fachen der Werte des Standardprotokolls gesteigert (II 2.2.8.1). Die Zellen wurden nach drei Tagen durch Immunzytochemie auf PSA-Expression untersucht (II 2.2.9). Es zeigte sich, dass die PSA-Synthese auch nach Transfektion der 16fachen Menge an pTM-PST/R277G nicht die Intensität des Wildtyps erreichte. Es konnte zudem festgestellt werden, dass sowohl für den Wildtyp als auch für TM-PST/R277G nach Unterschreiten eines Schwellenwertes, der bei einem Viertel der üblicherweise transfizierten DNA-Menge lag, die Transfektionseffizienz drastisch abnahm. Mit TM-STX/M333V transfizierte 2A10-Zellen blieben in allen Experimenten PSA-negativ.

III 2.5.2 Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in COS-Zellen

Es ist seit längerem bekannt, dass Zellen, die kein NCAM und keine Polysialyltransferasen exprimieren, wie z.B. COS-Zellen, nach der Transfektion mit PST auf der Zelloberfläche PSA tragen. Unklar ist, ob es sich dabei um autopolysialylierte PST, einen bislang unbekannt polysialylierten Akzeptor oder um unspezifisch gebundene PSA-Ketten handelt. Nun sollte untersucht werden, ob auch PST-Mutanten, die *in vitro* autokatalytisch keine PSA synthetisieren können, nach Transfektion in COS-Zellen zur Expression von PSA an der Zelloberfläche führen. Dazu wurden die Transmembranformen der Mutanten transient in COS-Zellen transfiziert und anschließend im Western Blot auf PSA-Expression analysiert (II 2.2.8.1, II 2.3.1, II 2.3.4, II 2.3.5). Parallel wurde die Proteinexpression durch Immunpräzipitation des Zelllysates mit dem anti-HA-Antikörper 12CA5 (II 2.3.7) und Entwicklung der Western Blots mit dem anti-Flag-Antikörper M5 überprüft.

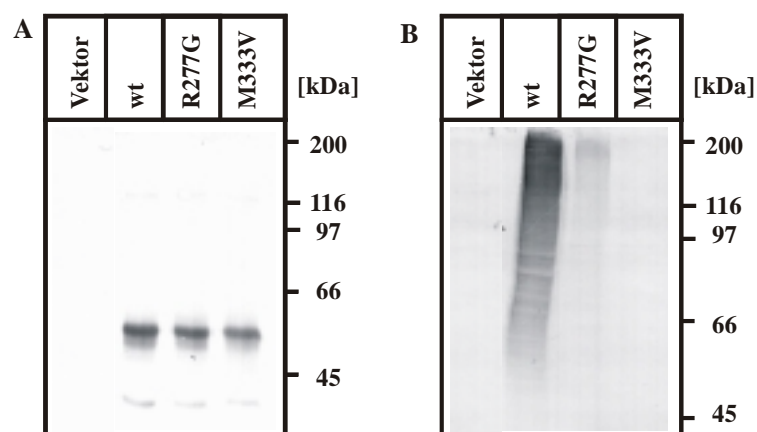


Abb. 27: Expression von TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in COS-Zellen. A) Proteinnachweis im Zelllysate B) PSA-Nachweis im Zelllysate.

Abb. 27A zeigt, dass alle Proteine auch in COS-Zellen gleichmäßig exprimiert wurden. Wie erwartet wies die PSA-Analyse der Zelllysate für Wildtyp-PST ein deutliches PSA-Signal nach (B). Die Mutante TM-PST/R277G zeigte, wie nach der Transfektion in 2A10-Zellen, eine stark verringerte Aktivität zur PSA-Synthese. TM-PST/M333V war auch in diesem Experiment komplett inaktiv.

III 2.5.3 Autopolysialylierung von TM-PST/R277G *in vivo*

Weiterhin sollte untersucht werden, ob es möglich ist, *in vivo* autopolysialylierte PST auch im Western Blot darzustellen. Dazu wurde die Transmembranform der Wildtyp-PST im Vergleich zu den Mutanten TM-PST/R277G und TM-PST/M333V transient in 2A10-Zellen transfiziert (II 2.2.8.1), anschließend aus dem Zelllysate mit 12CA5 immunpräzipitiert (II 2.3.7) und im Western Blot zur Kontrolle der Proteinexpression mit dem Antikörper M5 detektiert (II 2.3.4, II 2.3.5). An die PST gebundene PSA-Ketten wurden mit dem Antikörper 735 nachgewiesen. In Abb. 28 kann man sehr deutlich das PSA-Signal der *in vivo* polysialylierten Wildtyp-PST erkennen (B). Auch an der Mutante TM-PST/R277G war noch PSA nachzuweisen, wenngleich das Signal im Blot nicht so intensiv wie das des Wildtyps gefärbt ist und auf kürzere Ketten hinweist. In jedem Fall bestätigt dieses Experiment, dass die Mutante TM-PST/R277G, die unter *in vitro*-Bedingungen nicht in der Lage ist, sich zu autopolysialylieren, diese Fähigkeit sowohl *in vitro* in Gegenwart von NCAM als auch *in vivo* partiell aufrechterhält.

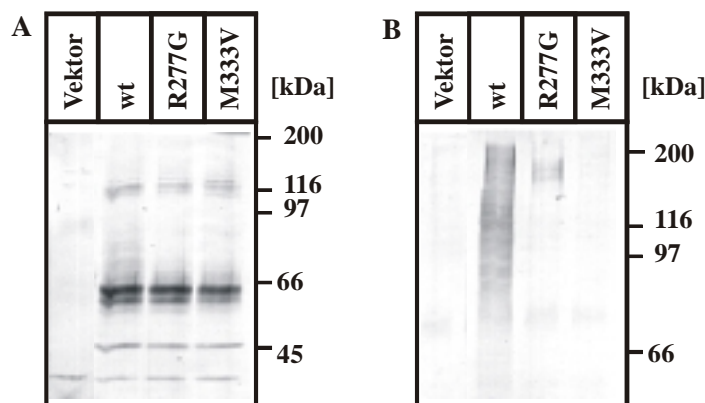


Abb. 28: *In vivo*-Autopolysialylierung der Mutanten TM-PST/R277G und TM-PST/M333V in 2A10-Zellen. A) Proteinnachweis im Zelllysate B) PSA-Nachweis im Zelllysate.

III 2.5.4 Ko-Expression von PST/R277G und PST/M333V in 2A10-Zellen

Im folgenden wurde versucht, durch Ko-Transfektionsexperimente zu klären, ob sich der Defekt von PST/R277G und PST/M333V gegenseitig aufheben lässt. Neben der Ko-Trans-

fektion der löslichen Konstrukte von PST/R277G und PST/M333V in 2A10-Zellen und den entsprechenden Einzeltransfektionen als Kontrolle (II 2.2.8.1) wurde ein paralleler Test durchgeführt, in dem beide Mutanten getrennt hergestellt und erst durch sequentielle Immunpräzipitation in Kontakt gebracht wurden. Anschließend wurde *in vitro* auf Autopolysialylierung getestet (II 2.3.15.1). Neben der Kontrolle der Proteinexpression im Zellkulturüberstand durch Immunpräzipitation mit 9E10 (II 2.3.7) wurden parallel die Zelllysate im Western Blot auf PSA-Expression untersucht (II 2.3.4, II 2.3.5). In Abb. 29 ist das Ergebnis dieses Experimentes dargestellt. In der Autopolysialylierung war nur der Wildtyp aktiv. Die ko-transfizierten und ko-immunpräzipitierten Kombinationen beider Mutanten wiesen wie die Mutanten alleine keine entsprechende Aktivität auf (Abb. 29A), wobei die gleichmäßige Expression aller Mutanten im Western Blot bestätigt wurde (B). Die identische Stärke der PSA-Signale im Zelllysate von ko-transfizierten 2A10-Zellen und von Zellen, die nur mit PST/R277G transfiziert wurden, zeigt, dass die Kombination beider Mutanten auch *in vivo* nicht zu einer verstärkten PST-Aktivität führte (C). Der Defekt der Mutanten PST/R277G und PST/M333V lässt sich also *in vitro* und *in vivo* gegenseitig nicht wieder aufheben.

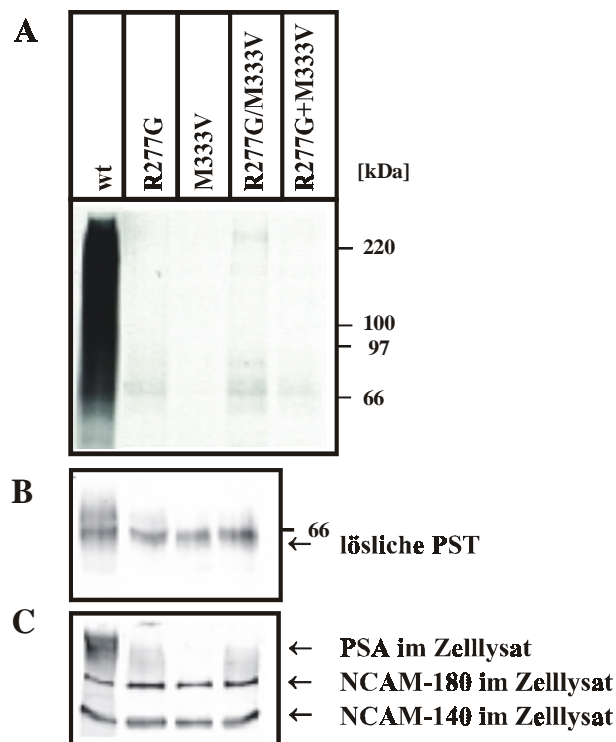


Abb. 29: Ko-Expression der Mutanten PST/R277G und PST/M333V in 2A10-Zellen. A) *in vitro*-Test auf Autopolysialylierung. R277G/M333V bezeichnet das Kotransfektionsexperiment, R277G+M333V bezeichnet das Experiment, in dem die Mutanten erst durch Immunpräzipitation zusammengebracht wurden. B) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand C) PSA-Nachweis im Zelllysate.

III 2.5.5 Ko-Expression von PST/M333V und Wildtyp-PST in 2A10-Zellen

Die Frage, ob zur Autopolysialylierung ein Dimer oder Multimer, in dem sich die Enzyme gegenseitig polysialylieren, gebildet werden muß, ist bis jetzt ungeklärt. Die Mutante PST/M333V eröffnet nun in dem Fall, dass deren Multimerisierungsfähigkeit erhalten geblieben und lediglich die Katalyse beeinträchtigt ist, die Möglichkeit, durch Verdrängungsstudien eine Komplexbildung zu beweisen. Diese Mutante würden dann, wenn sie im Überschuß vorliegt, den Wildtyp aus dem katalytisch aktiven Multimer verdrängen und so die PSA-Synthese inhibieren. Zuerst wurde versucht, die PSA-Synthese in CHO-K1-Zellen durch Transfektion steigender Mengen pTM-PST/M333V zu inhibieren (II 2.2.8.1). Die Expression von TM-PST/M333V zeigte jedoch keinen Effekt. Dieses Ergebnis könnte durch eine zu große Halbwertszeit der PSA-Ketten, welche die Dauer eines Transfektionsexperimentes überschreitet, bedingt sein. Deswegen wurden Ko-Transfektionsexperimente mit Wildtyp-DNA in 2A10-Zellen durchgeführt. Das Verhältnis der DNA-Mengen von Wildtyp und TM-PST/M333V wurde dabei bis 1:100 variiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jedem Transfektionsansatz eine konstante Menge pCMVlacZ, ein Plasmid, welches das Gen für die β -Galaktosidase enthält, zugegeben. Die Gesamtmenge an DNA und damit auch die Proteinbiosyntheseaktivität der Zielzelle wurde durch Supplementation mit einer cDNA-Bank aus CHO-K1-Zellen konstant gehalten. Parallele Ansätze wurden nun auf die Expression von PSA- und β -Galaktosidase überprüft (II 2.2.9, II 2.2.10). Es zeigte sich, dass auch in diesem Experiment die PSA-Expression durch Zugabe von TM-PST/M333V nicht inhibiert werden konnte. Die Kontrollen bestätigten, dass die Transfektionseffizienz in allen Experimenten zwischen 40 und 50% lag. Ein weiteres Experiment, in dem statt TM-PST/M333V die komplett inaktive Mutante TM-PST/T189I eingesetzt wurde, bestätigte auch für diese Mutante das Ausbleiben einer Interaktion mit dem Wildtypenzym.

III 2.5.6 Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität von PST/M333V und PST/M333L

Wie der Vergleich der α 2,8-Sialyltransferasen in Abb. 15 zeigt, befindet sich anstelle des Methionin³³³ in der ST8SiaIII ein Leucin. Da diese Sialyltransferase auch in der Lage ist, sich zu autopolysialylieren [148], sollte nun untersucht werden, ob PST mit einem Leucin an Position 333 ebenfalls aktiv ist. Die Mutante PST/M333L wurde in löslicher Form durch Fusions-PCR mit den Primern MW43, MW44, ME25 und BGH (II 2.1.14), anschließendem Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI und Ligation in den Vektor pPST-MycHis generiert. PST/M333L wurden dann im Vergleich zu PST/M333V auf *in vitro*- und *in vivo*-

Aktivität getestet. In Abb. 30 ist das Ergebnis dargestellt. PST/M333L verhielt sich in allen Tests exakt wie der Wildtyp. PST/M333V zeigte im Gegensatz dazu das schon unter III 2.3 beschriebene Aktivitätsmuster: keine Autopolysialylierung *in vitro* (A), geringfügig reduzierte NCAM-Polysialylierung *in vitro* (B) sowie keine NCAM-Polysialylierung *in vivo* (C) bei Proteinexpression auf Wildtypniveau (D, E). Auch hier ist für PST/M333V *in vitro* in Gegenwart von NCAM der geringe autokatalytische Einbau von radioaktivem Substrat zu erkennen (B). Die von PST/M333V an NCAM synthetisierten PSA-Ketten waren im Vergleich zu den von PST/M333L und dem Wildtyp gebildeten deutlich kürzer. Weiterhin erkennt man in der Kontrolle der Proteinexpression im Zellkulturüberstand (D), dass die Bande von PST/M333V fokussierter als die Wildtypbande ist. Dieser Befund ist ein Hinweis auf die auch *in vivo* ausgebliebene Autopolysialylierung von PST/M333V.

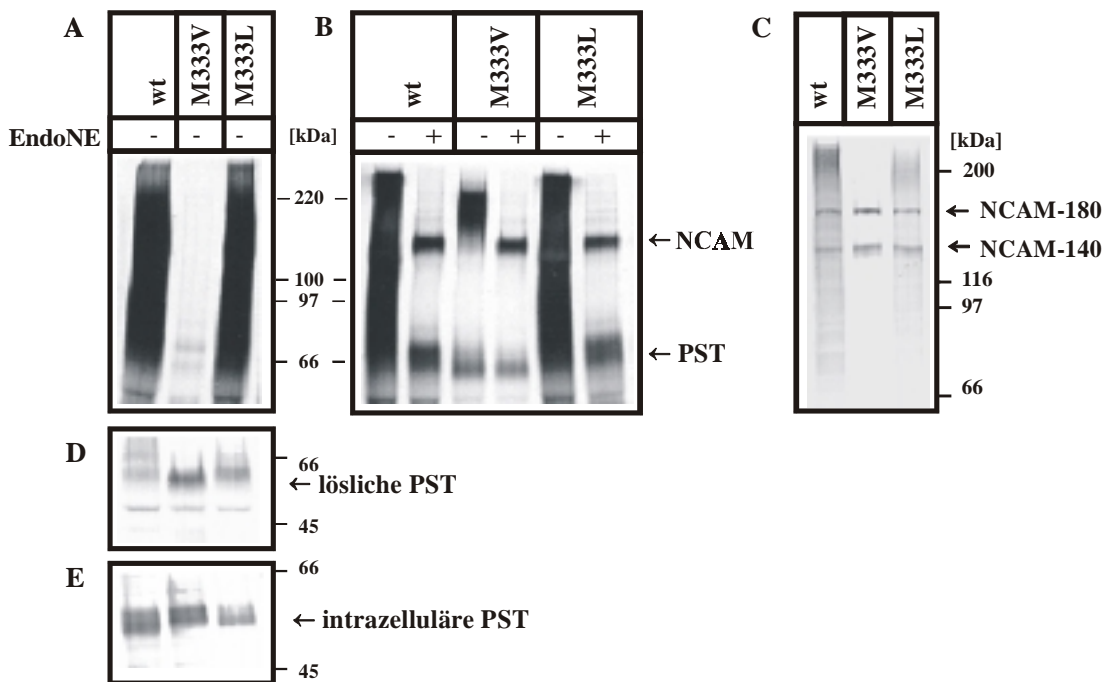


Abb. 30: *In vitro*-Aktivitätstest von PST/M333V und PST/M333L. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysat E) PSA-Nachweis im Zelllysat.

III 2.6 Charakterisierung der Mutanten PST/M284I, STX/M299I, PST/Q359R

Im Zuge der Sequenzierung der aus Zellen der Komplementationsgruppe 2A10 stammenden PST-cDNAs (III 1.4) wurden für den Klon 2B12 in einem von drei sequenzierten Plasmiden neben der Stop-Mutation (Glutamin³⁵→stop) zwei weitere Punktmutationen entdeckt. Diese

liegen C-terminal von der Stop-Mutation und würden in einem hypothetischen Protein die Austausch Methionin²⁸⁴→Isoleucin und Glutamin³⁵⁹→Arginin bewirken. Da dieser Bereich des Proteins nicht mehr transkribiert wird und somit für den Defekt des Klons 2B12 nicht verantwortlich sein kann und da zwei weitere Plasmide diese Mutationen nicht aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass es sich entweder um Fehler der *Taq*-DNA-Polymerase oder um die cDNA eines Subklons von 2B12 handelt. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Aktivität der Polysialyltransferasen wurden dennoch untersucht. Dazu wurden beide Mutationen in die lösliche Form der PST, und die Methionin-Mutation ebenfalls in die lösliche Form der STX eingefügt. Die Übertragung der Glutamin-Mutation in die STX erübrigte sich, da beide Polysialyltransferasen C-terminal des letzten Cysteins (PST: Cystein³⁵⁶, STX: Cystein³⁷¹) keine Homologie aufweisen.

Die Konstrukte pPST/M284I und pPST/Q369R wurden durch Fusions-PCR mit den Primern MW34, MW35, ME25, BGH bzw. MW36, MW37, ME25, MA26 (II 2.1.14), anschließend Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI bzw. *Bam*HI und *Xba*I und Ligation in die entsprechenden Schnittstellen von pPST-MycHis generiert. Für das Konstrukt pSTX/M299I wurden die Primer MW41, MW42A, BGH und CB14 sowie die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xba*I verwendet. Die Mutanten wurden transient in 2A10-Zellen transfiziert (II 2.2.8.1), aus dem Zellkulturüberstand immunpräzipitiert (II 2.3.7) und wie schon unter III 2.3 für die anderen Mutanten beschrieben *in vitro* und *in vivo* auf ihre Polysialylierungsaktivität getestet. Die Mutante PST/Q359R zeigte in allen Tests Wildtypaktivität (nicht gezeigt). Die Methionin-Mutanten dagegen besitzen ein bisher noch nicht aufgetretenes Aktivitätsprofil. Die Testergebnisse sind in Abb. 31 aufgeführt. Um ausreichende Signalintensitäten zu erreichen, wurde von den Mutanten die doppelte Menge Zellkulturüberstand pro Ansatz in die Immunpräzipitation eingesetzt. *In vitro* zeigten beide Mutanten ein Verhalten, das unter III 2.3 schon für die Mutanten PST/M333V bzw. STX/M348V beschrieben wurde: Verlust der Autopolysialylierungsaktivität, wobei für PST/M284I deutlicher als für PST/M333V eine geringe Restaktivität zu beobachten war, sowie nahezu vollständige NCAM-Polysialylierungsaktivität, die im Fall der PST-Mutante ebenfalls von wiedergewonnener Autopolysialylierungsaktivität begleitet wurde. *In vivo* unterschieden sich die Aktivitäten der Methionin-Mutanten jedoch erheblich. Im Gegensatz zu PST/M333V und STX/M348V, die jegliche Aktivität verloren haben, sind PST/M284I und STX/M299I in der Lage, den Defekt der 2A10-Zellen zu komplementieren.

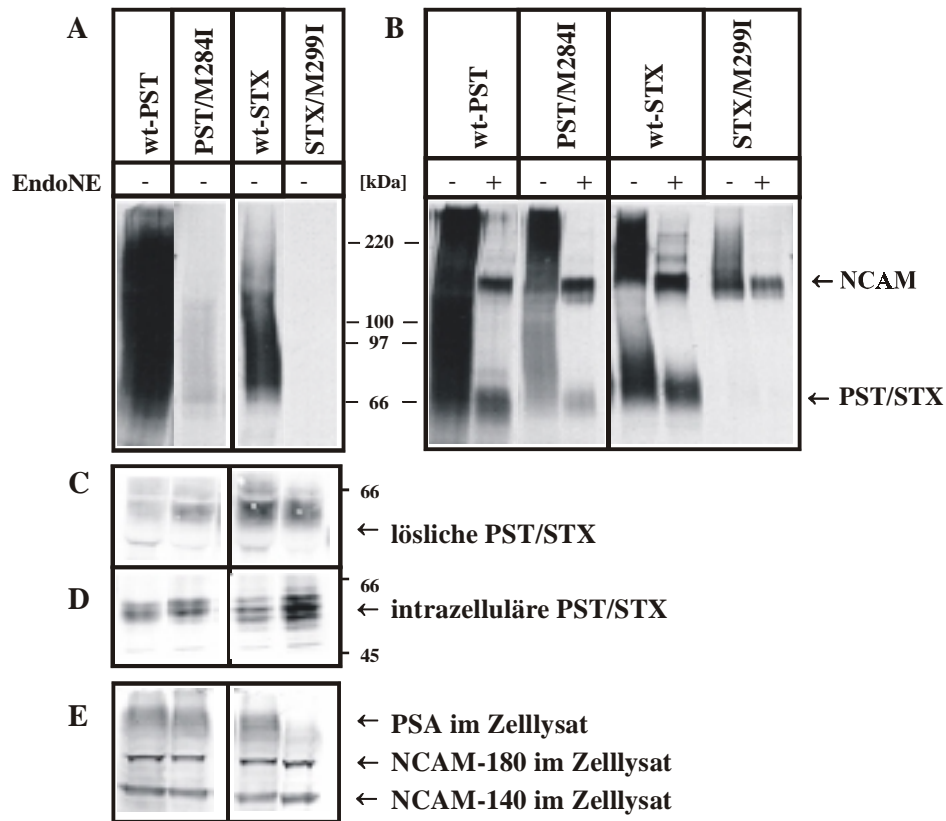


Abb. 31: *In vitro*-Aktivitätstest von PST/M284I und STX/M299I. Von den Mutanten wurde im Vergleich zum Wildtyp doppelt so viel Zellkulturüberstand pro Ansatz immunpräzipitiert. A) Autopolysialylierung B) NCAM-Polysialylierung C) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand D) Proteinnachweis im Zelllysate E) PSA-Nachweis im Zelllysate.

III 3 Studien zur Eingrenzung der katalytischen Domäne der PST

Mit dem Ziel, den Bereich der PST, der zur Aktivität notwendig ist, einzugrenzen, wurden N- und C-terminale Verkürzungen hergestellt. Da die löslichen Konstrukte der PST mit Aminosäure 26 beginnen und aktiv sind, steht fest, dass der zytoplasmatische Teil und die Transmembrandomäne für die Aktivität nicht wichtig sind. Am N-Terminus wurde die PST nun weiter verkürzt. Das Konstrukt PST44 beginnt mit Leucin⁴⁴ und ist um die ersten beiden Cysteine, von denen der erste in der Transmembranhelix liegt, verkürzt. Im Konstrukt PST59, welches als erste Aminosäure Alanin⁵⁹ aufweist, fehlt zusätzlich die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle. Die N-terminalen Verkürzungen sind in Abb. 32 dargestellt.

```

1
Met Arg Ser Ile Arg Lys Arg Trp Thr Ile Cys Thr Ile Ser
                                                    ↗ lösliche Konstrukte
15
Leu Leu Leu Ile Phe Tyr Lys Thr Lys Glu Ile Ala Arg Thr

29
Glu Glu His Gln Glu Thr Gln Leu Ile Gly Asp Gly Glu Leu
43   ↗ PST44
Cys Leu Ser Arg Ser Leu Val Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ile
57   ↗ PST59
Arg Lys Ala Gly Ser...
    
```

Abb. 32: Schematische Darstellung der N-terminalen PST-Verkürzungen. Cysteine sind fett, potentielle N-Glykosylierungsstellen fett und kursiv geschrieben.

Die C-terminalen Verkürzungen basieren auf dem Homologievergleich mit anderen α 2,8-Sialyltransferasen (siehe Abb. 15). Die Aminosäuresequenzen dieser Enzyme weisen C-terminal des konservierten Cysteins keine Ähnlichkeit auf. Dieses Cystein ist essentiell, wie an der Mutante PST/C356F, die keine katalytische Aktivität besitzt und zudem kaum von den Zellen sekretiert wurde, deutlich wird (vgl. Abb. 21). Die letzte Aminosäure der PST, Glutamin³⁵⁹ kann ohne Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms durch Arginin ersetzt werden (III 2.6). Ob sie allerdings ganz fehlen darf, wurde anhand der PST-Verkürzung PST/K358stop untersucht. Den kürzesten C-Terminus haben die α 2,8-Sialyltransferasen der Subklasse III. Da ST8SiaIII auch in der Lage ist, sich selbst zu polysialylieren, war es nun interessant, die Aktivität einer PST, die den C-Terminus dieses Enzyms aufweist (PST/M357Astop), zu untersuchen. Ob überhaupt Aminosäuren C-terminal von Cystein³⁵⁶ benötigt werden, sollte die Mutante PST/C356stop klären. Abb. 33 fasst alle C-terminalen PST-Verkürzungen zusammen.

PST-Wildtyp:	³⁵⁶ Cys Met Lys Gln
PST/K358stop:	Cys Met Lys
PST/M357Astop:	Cys Ala
PST/C356stop:	Cys

Abb. 33: Darstellung der C-terminalen Verkürzungen der PST. Aufgeführt ist der Bereich ab Cystein³⁵⁶.

III 3.1 Herstellung und Charakterisierung von N- und C-terminal verkürzten PST-Varianten

Die N-terminalen Verkürzungskonstrukte pPST44 und pPST59 wurden durch PCR mit den Primern MW18 bzw. MW19 und MM17 amplifiziert (II 2.1.13) und nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Kpn*I in pPST-MycHis ligiert (II 2.1.7, II 2.1.9). Die C-terminal verkürzten Konstrukte pPST/K358stop, pPST/M357Astop und pPST/C356stop wurden durch PCR mit den Primerpaaren MW38/ME25, MW45/ME25 und MW46/ME25, anschließend Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xba*I und Ligation in pPST-MycHis generiert. Alle PST-Verkürzungen wurden transient in 2A10-Zellen transfiziert und nach der Immunpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand auf ihre *in vitro*-Aktivität getestet. Parallel wurden die Zelllysate auf PSA- und Proteinexpression überprüft. Der Ablauf des *in vitro*-Tests fand wie unter III 2.3 beschrieben statt. Alle N- und C-terminalen PST-Verkürzungen stimmten in ihrer Aktivität exakt mit dem Wildtyp überein (nicht gezeigt). Die ersten 58 und die letzten drei Aminosäuren der PST sind demzufolge für die katalytische Aktivität nicht notwendig.

III 4 Studien zur Bedeutung der Cysteine in der PST

Die in der PST-cDNA des Klons 2D8 identifizierte Mutation C356F, welche zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Enzyms führt, unterscheidet sich von den anderen 2A10-Punktmutationen dadurch, dass sie die Stabilität des resultierenden Proteins oder dessen Sekretierbarkeit deutlich herabsetzt. Dieser besonders schwere Defekt von PST/C356F wirft die Frage auf, ob hier die Struktur der mutierten PST durch die Zerstörung einer Disulfidbrücke verändert wurde. PST hat insgesamt sieben Cysteine, von denen das erste (Cystein¹¹) in der Transmembrandomäne lokalisiert ist. Das zweite Cystein⁴³ ist für die Aktivität der PST ebenfalls nicht notwendig, da PST44 komplette katalytische Aktivität besitzt (siehe III 3.1). Diese ersten beiden Cysteine werden im folgenden nicht weiter beachtet. Von den restlichen fünf Cysteinen befinden sich drei im großen L-Sialylmotiv, eins im kleinen S-Sialylmotiv und das fünfte, welches im 2A10-Klon 2D8 mutiert ist, liegt direkt am C-Terminus. Die Cysteine in der PST sind in der Familie der Sialyltransferasen unterscheidlich hoch konserviert. Im Gegensatz zu den Cysteinen an den Positionen 142 und 292, die in allen Sialyltransferasen vorhanden sind, sind die Cysteine an den Positionen 156, 169 und 356 nur in der Unterfamilie der α 2,8-Sialyltransferasen konserviert. Die Lage der Cysteine im PST-Protein ist in Abb. 34 schematisch dargestellt. Diese fünf Cysteine wurden nun jeweils durch Alanin ersetzt und die Mutanten charakterisiert.

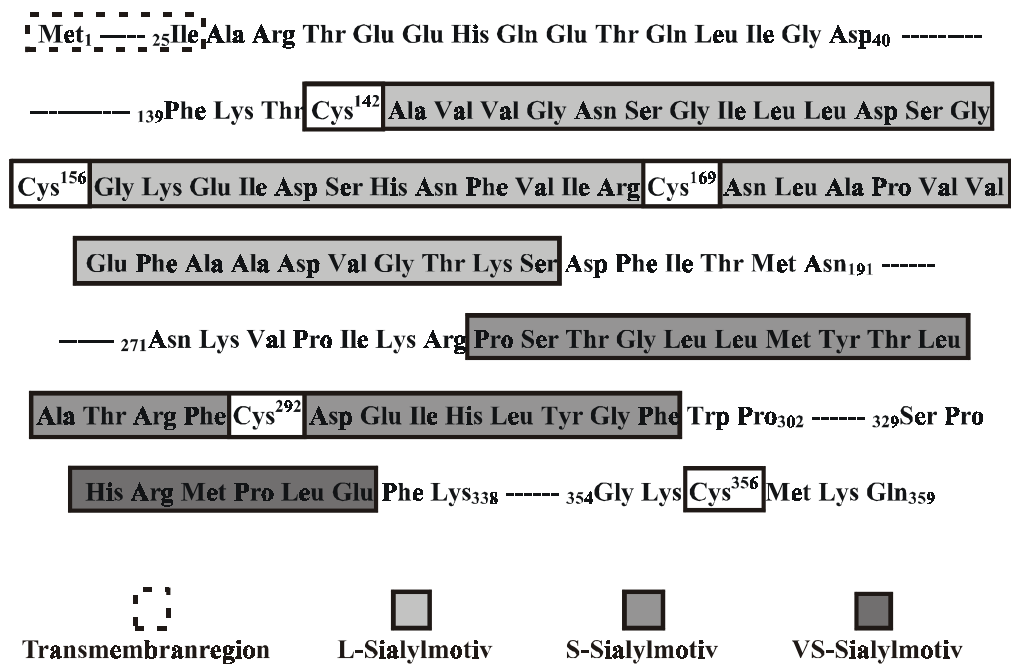


Abb. 34: Schematische Darstellung der Cysteine im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive.

III 4.1 Herstellung und Charakterisierung der Cysteinmutanten

Alle Cysteinmutanten wurden in löslicher Form durch Fusions-PCR (II 2.1.14), Restriktionsverdau der PCR-Fragmente und Klonierung in das entsprechend verdaute Plasmid pPST-MycHis hergestellt. In Tab. 9 sind die zur Mutagenese verwendeten Primer und Restriktionsenzyme aufgeführt.

Konstrukt	PCR 1	PCR 2	Restriktionsenzyme
pPST/C142A	MW8/MM17	MW9/MM26	<i>Bam</i> HI/ <i>Esp</i> 3I
pPST/C156A	MW10/MM17	MW11/MM26	<i>Bam</i> HI/ <i>Esp</i> 3I
pPST/C169A	MW12/MM17	MW13/MM26	<i>Bam</i> HI/ <i>Esp</i> 3I
pPST/C292A	MW14/MM17	MW15/ME25	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pPST/C356A	MW16/MA26	MW17/ME25	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I

Tab. 9: Zur Mutagenese der Cysteinmutanten der PST verwendete Primer und Restriktionsenzyme.

Die Charakterisierung der Cysteinmutanten erfolgte zunächst, wie schon zuvor für die 2A10-Mutanten in III 2.3 beschrieben, durch Transfektion der Konstrukte in 2A10-Zellen, Immunpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand und *in vitro*-Aktivitätstest bei gleichzeitiger Kontrolle der Proteinexpression im Medium und in den Zelllysaten. Die ersten Tests zeigten jedoch, dass die Mutanten wenn überhaupt sehr schlecht exprimiert wurden. Der Versuch, alle Mutanten rekombinant herzustellen, ist in Abb. 35 dargestellt. Aufgeführt sind Immun-

präzipitationen mit dem anti-Myc-Antikörper 9E10, die zum einen mit Zellkulturüberstand und zum anderen mit dem Zelllysats der transfizierten 2A10-Zellen durchgeführt wurden. Die Western Blots wurden ebenfalls mit 9E10 entwickelt. Alle Cysteinmutanten mit Ausnahme von PST/C356A ließen sich weder im Medium (A) noch intrazellulär (B) nachweisen. PST/C356A dagegen wurde in der Zelle auf Wildtypniveau exprimiert aber schlechter ins Medium sekretiert, wenngleich noch geringe Mengen im Zellkulturüberstand nachzuweisen waren. Damit verhält sich PST/C356A exakt wie die schon in III 2 beschriebene 2A10-Mutante PST/C356F. Dieser Versuch wurde in COS-Zellen wiederholt und führte dort zu den gleichen Ergebnissen.

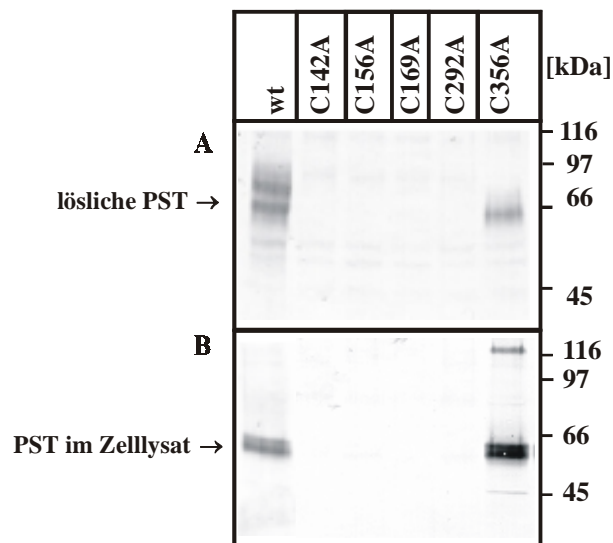


Abb. 35: Expression der Cysteinmutanten der PST in 2A10-Zellen. A) Proteinnachweis im Zellkulturüberstand B) Proteinnachweis im Zelllysats.

III 4.2 Herstellung und Charakterisierung von PST/C356S

Um zu untersuchen, ob die Thiol-Gruppe des Cystein³⁵⁶ auch durch eine Hydroxyl-Gruppe ersetzt werden kann, wurde die Mutante PST/C356S, welche anstelle des Cysteins ein Serin aufweist, generiert und analysiert. Die Mutagenese wurde mit den Primern MW39, MW40, ME25 und MA26 mittels Fusions-PCR durchgeführt (II 2.1.14). Die PCR-Fragmente wurden mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut und in pPST-MycHis ligiert. PST/C356S wurde wie die anderen Mutanten nach rekombinanter Expression in 2A10-Zellen aus dem Medium immunpräzipitiert und auf *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität bei paralleler Kontrolle der Proteinexpression getestet. Es stellte sich heraus, dass PST/C356S die gleichen Beeinträchtigungen wie PST/C356F und PST/C356A zeigte: keine Aktivität, intrazelluläre Expression auf Wildtypniveau und eine verminderte Sekretion der Mutante ins Medium. Die Thiol-Gruppe von Cystein³⁵⁶ lässt sich also nicht durch eine Hydroxyl-Gruppe ersetzen.

III 5 Rekombinante Herstellung und Reinigung von PST- und STX-MycHis-Fusionsproteinen

Um ausreichend Material zur weiteren Charakterisierung von PST und STX, z.B. mit dem Fernziel der Aufklärung der Disulfidbrücken, zur Verfügung zu haben, wurden die löslich exprimierte MycHis-Fusionsproteine beider Polysialyltransferasen aus dem Medium von stabil transfizierten 2A10-Zellen (2A10-PST-MH, 2A10-STX-MH) aufgereinigt. Zur Gewinnung des Zellkulturüberstandes wurde, wie unter II 2.2.4 beschrieben, das Medium über den adhären Zellen, das die rekombinanten Proteine enthält, mehrmals geerntet und der partikelfreie Überstand eingefroren.

III 5.1 Aufreinigung der Fusionsproteine nach Ankonzentrierung im Filtron

In einem ersten Versuch wurde von jedem Fusionsprotein in 15 Ernten ca. 7 Liter Zellkulturüberstand gewonnen, der anschließend mit dem Filtron, wie unter II 2.3.12 beschrieben, auf ca. 150 ml ankonzentriert wurde. Die Anlagerung der Fusionsproteine an die Gelmatrix (9E10-ProteinG-Sepharose) wurde entweder im ‚Batch‘-Verfahren oder direkt über eine Säule durchgeführt. Die Elution fand nach intensivem Spülen der Säule mit Glycinpuffer (pH 2,7) und in Fraktionen á 1 ml, die sofort neutralisiert wurden, statt. Dabei wurden jeweils vor und nach der Ankonzentrierung und dem Säulenauftrag sowie von den Waschpuffern Proben entnommen. Die darin enthaltenen Fusionsproteine wurden nach Immunpräzipitation mit 9E10-Sepharose zusammen mit Aliquots der Fraktionen in der SDS-PAGE und im Western Blot analysiert. Der Ablauf der Aufreinigung ist unter II 2.3.13.2 genauer beschrieben.

III 5.1.1 STX-MycHis

Die Ergebnisse der Ankonzentrierung und Aufreinigung des STX-MycHis-Fusionsproteins ist im folgenden dargestellt. Abb. 36 zeigt die Immunpräzipitationen zur Überprüfung des Ausgangsmaterials, der Durchläufe und der Waschpuffer. In Spur 1 ist der filtrierte Zellkulturüberstand vor der Ankonzentrierung aufgetragen. Man erkennt die Bande des STX-MycHis-Fusionsproteins bei ca. 60 kDa. Zur Kontrolle wurde der Durchlauf der Ankonzentrierung ebenfalls mit 9E10-ProteinG-Sepharose immunpräzipitiert und in Spur 2 des Gels aufgetrennt. Da kein Signal vorhanden ist, kann man davon ausgehen, dass bei diesem Schritt keine Verluste an Fusionsprotein aufgetreten sind. Der Vergleich des eingesetzten Zellkulturüberstandes (Spur 1) mit dem Konzentrat (Spur 3) zeigt deutlich, dass ein Großteil des Fusionsproteins, das nun in Bereichen zwischen 30 bis 45 kDa im Western Blot zu erkennen

ist, durch die Ankonzentrierung degradiert wurde. Spuren 4 und 5, in denen die Immunpräzipitationen der Säulendurchläufe der ersten bzw. der dritten Anlagerung aufgetragen sind, zeigen, dass auch der dreimal extrahierte Zellkulturüberstand noch STX-MycHis enthält und somit noch einmal angelagert werden könnte. Spuren 6 und 7 verdeutlichen, dass durch Waschen der Säule nach der dritten Anlagerung noch ein erheblicher Teil des Fusionsproteins von der Säule gespült wurde. Da auch die Waschpuffer der ersten beiden Anlagerungen relativ viel STX-MycHis enthielten, wurden diese zusammen mit dem zuvor schon angelagerten Zellkulturüberstand bei der nächsten Säulenlagerung erneut extrahiert.

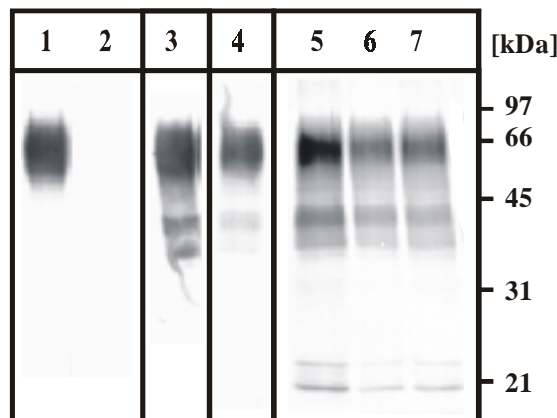


Abb. 36: Überprüfung der Durchläufe und Waschpuffer der Aufreinigung des STX-MycHis-Fusionsproteins (Immunpräzipitationen). 1) Zellkulturüberstand vor der Ankonzentrierung 2) Durchlauf der Ankonzentrierung 3) Konzentrat (zweite Spülung des Filtrons mit PBS) 4) Zellkulturüberstand nach der ersten Anlagerung an die 9E10-Säule 5) Zellkulturüberstand nach der dritten Anlagerung 6) PBS-Waschpuffer der dritten Anlagerung 7) Hochsalz-Waschpuffer der dritten Anlagerung.

In Abb. 37 ist die Analyse der Elution nach der zweiten Säulenlagerung dargestellt. Dazu wurden jeweils 1,4% (13,6 µl) der Fraktionen 2 bis 7 in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Silbergel (A) und im Western Blot (B) überprüft. Im Silbergel wird deutlich, dass das Fusionsprotein konzentriert in einer Hauptfraktion (4) von der Säule eluierte. Ab Fraktion 5 wurde ein weiteres Protein abgelöst, das eine Größe von ca. 55 kDa aufweist und im Western Blot (B) mit 9E10 nicht angefärbt wurde. Die genauere Untersuchung in einem Western Blot mit anti-STX-Antikörpern ergab, dass es sich bei diesem Protein nicht um ein Abbauprodukt des STX-MycHis-Fusionsproteins handelt. Im Western Blot der Fraktionen (B) erkennt man erneut, dass das Fusionsprotein stark degradiert vorlag und nahezu die Hälfte nicht mehr seine ursprüngliche Größe aufwies.

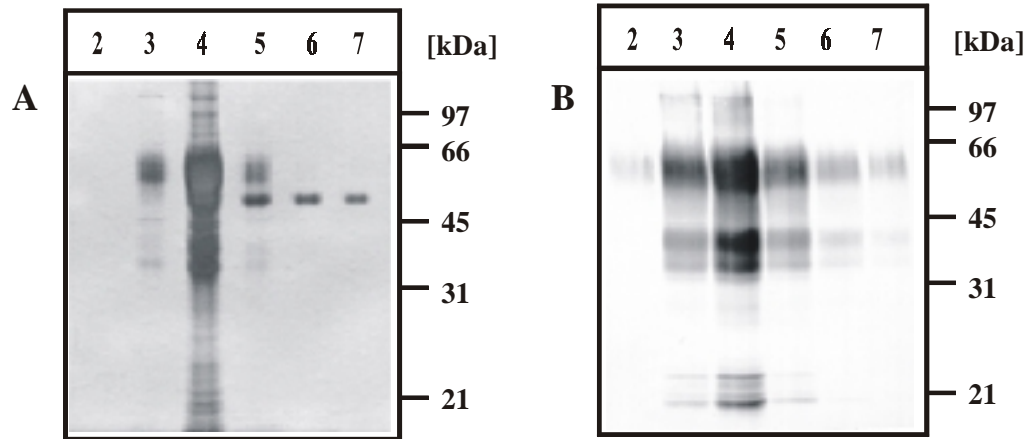


Abb. 37: Elutionsprofil des STX-MycHis-Fusionsproteins nach der dritten Anlagerung an die Säule. Aufgetragen sind jeweils 1,4% (13,6 μ l) der Fraktionen 2 bis 7. A) Silbergel B) Western Blot.

III 5.1.2 PST-MycHis

Die Aufreinigung des PST-MycHis-Fusionsproteins erfolgte wie schon unter III 5.1.1 für STX-MycHis beschrieben. Abb. 38 zeigt die Analyse der Immunpräzipitationen zur Kontrolle der Ankonzentrierung und Aufreinigung von PST-MycHis. In Spur 1 erkennt man das Ausgangsmaterial in einer einzigen Bande bei ca. 66 kDa. Die Analyse des Filtrations-Durchlaufes in Spur 2 zeigt, dass auch hier die Ankonzentrierung ohne Verluste verlief. Spur 3, in der die Immunpräzipitation der dritten Spülung des Filtrations nach dem Einengen der Probe aufgetragen wurde, verdeutlicht, dass auch ein Großteil des PST-Fusionsproteins degradiert worden war. Desweiteren sind die Analysen der Waschlösungen der ersten und zweiten Aufreinigung dargestellt. Neben den Immunpräzipitationen der Waschlösungen der ersten Aufreinigung (Spuren 4 und 5) wurden Aliquots dieser Waschlösungen auch direkt auf das SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot (Spuren 6 und 7) und im Silbergel (Spuren 8 und 9) analysiert. Im Western Blot ist im Direktauftrag nur die Bande mit dem vollständigen Fusionsprotein zu sehen. Die zahlreichen Abbauprodukte wurden erst durch Anreicherung auf der Sepharosematrix darstellbar. Das Silbergel zeigt, dass durch den ersten Waschlösungsschritt sehr viele unspezifische Proteine von der Säule gespült wurden. Durch den Waschlösungsschritt mit Hochsalz-Puffer wurde keine weitere Reinigung erzielt. Nach der zweiten Anlagerung war die Konzentration des Fusionsproteins im Säulendurchlauf (Spur 10) und in den Waschlösungen (Spuren 11 und 12) so weit erniedrigt, dass nur das nicht-degradierte Material darstellbar war. Die Menge an Fusionsprotein in 1,5 ml des Durchlaufes und der Waschlösungen entsprach damit ungefähr der Menge, die in ca. 14 μ l des Waschlösungspuffers aus der ersten Anlagerung vorhanden war (Direktauftrag: Spuren 6 und 7).

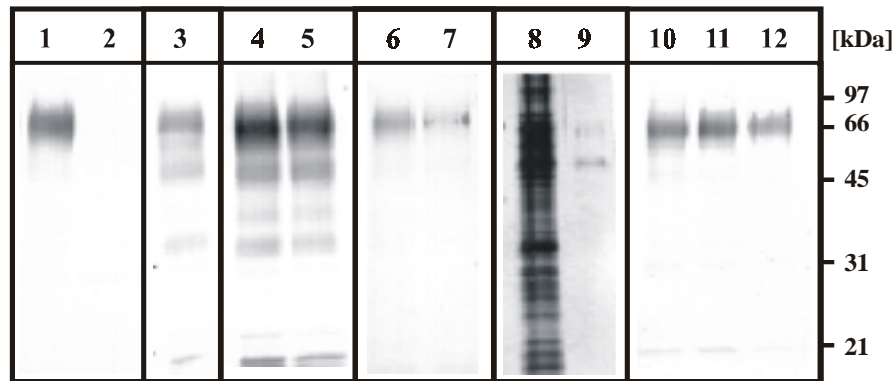


Abb. 38: Überprüfung der Durchläufe und Waschpuffer der Aufreinigung des PST-MycHis-Fusionsproteins (Immunpräzipitationen). 1) Zellkulturüberstand vor der Ankonzentrierung 2) Durchlauf der Ankonzentrierung 3) Konzentrat (dritte Spülung des Filtrons mit PBS) 4) PBS-Waschpuffer der ersten Anlagerung 5) Hochsalz-Waschpuffer der ersten Anlagerung 6) PBS-Waschpuffer der ersten Anlagerung (keine Immunpräzipitation, Direktauftrag von 13,6 µl aus einem Gesamtvolumen von 30 ml) 7) Hochsalz-Waschpuffer der ersten Anlagerung (keine Immunpräzipitation, Direktauftrag von 13,6 µl von 30 ml Gesamtvolumen) 8) wie Spur 6, nur Analyse im Silbergel 9) wie Spur 7, nur Analyse im Silbergel 10) Zellkulturüberstand nach der zweiten Anlagerung 11) PBS-Waschpuffer der zweiten Anlagerung 12) Hochsalz-Waschpuffer der zweiten Anlagerung.

In Abb. 39 sind die Fraktionen 1 bis 6 der Elution nach der ersten Anlagerung im Silbergel (A) und im Western Blot (B) dargestellt. Die Resultate stimmen mit den zuvor für STX-MycHis erzielten überein. Das Protein eluierte konzentriert in einer Hauptfraktion (Spur 3), war stark degradiert und ab der 3. oder 4. Fraktion wurde ein weiteres Protein von der Säule abgelöst, dessen Herkunft unbekannt ist.

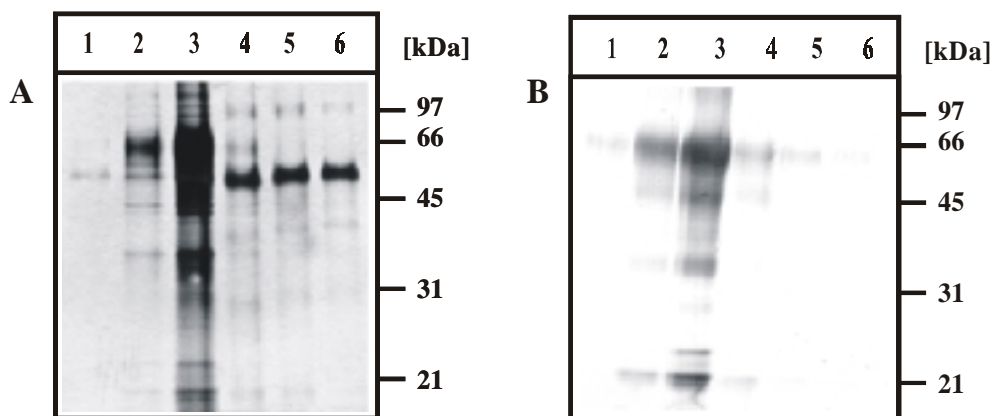


Abb. 39: Elution des PST-MycHis-Fusionsproteins nach der ersten Anlagerung an die Säule. Aufgetragen sind jeweils 1,4% (13,6 µl) der Fraktionen 1 bis 6. A) Silbergel B) Western Blot.

III 5.2 Aufreinigung von PST-MycHis ohne vorherige Ankonzentrierung

Da sich herausstellte, dass die Ankonzentrierung der Fusionsproteine mit erheblicher Degradation verbunden war und die Säulenkapazität für derartig konzentrierte Lösungen nicht ausreichte, wurden die Fusionsproteine nun direkt ohne vorherige Ankonzentrierung aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Pro Aufreinigung, die ebenfalls wie in II 2.3.13.2 beschrieben durchgeführt wurde, wurde ca. 1 Liter Überstand eingesetzt. In Abb. 40 ist das Ergebnis einer Aufreinigung anhand der Analyse der Immunpräzipitationen der Durchläufe (A) und Waschpuffer (B) sowie der Direktauftragungen der Fraktionen im Western Blot (C) und Silbergel (D) dargestellt.

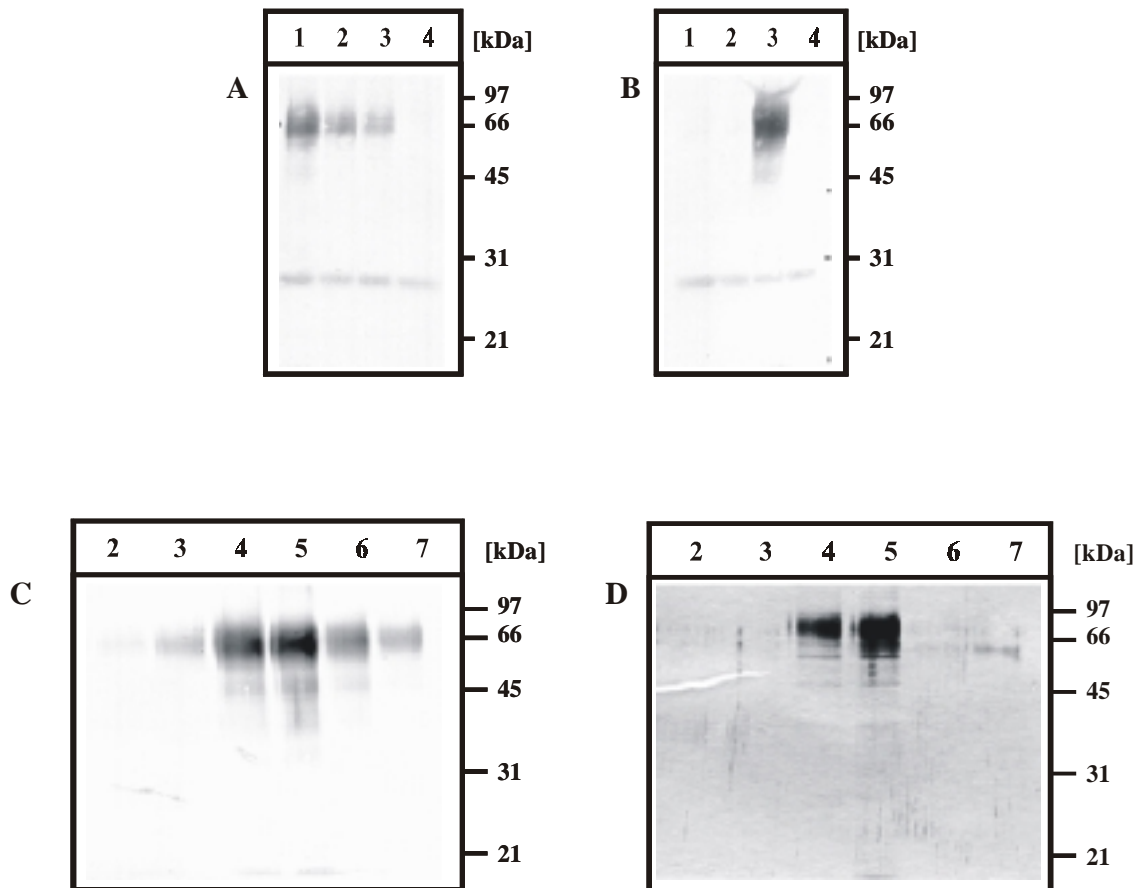


Abb. 40: Aufreinigung von PST-MycHis ohne vorherige Ankonzentrierung. A) Analyse der Säulendurchläufe (Immunpräzipitationen) 1) Zellkulturüberstand vor der ersten Anlagerung 2) Zellkulturüberstand nach der ersten Anlagerung 3) Zellkulturüberstand nach der zweiten Anlagerung 4) Zellkulturüberstand nach der dritten Anlagerung B) Analyse der Waschpuffer nach der ersten Aufreinigung (Immunpräzipitationen) 1) PBS 2) Hochsalz-Puffer 3) Glycin-Nachspül-Puffer 4) PBS-Nachspül-Puffer C) Fraktionen 2 bis 7 der Elution der ersten Aufreinigung (Direktauftrag von 10 µl), Western Blot-Analyse D) wie C) nur Analyse im Silbergel.

Der Western Blot (A), in dem das Ausgangsmaterial (Spur 1) und die Säulendurchläufe der drei Anlagerungen (Spuren 2 bis 4) durch 9E10-Immunpräzipitationen analysiert wurden, verdeutlicht, dass durch dreimaliges Anlagern des Zellkulturüberstandes an die Säule das Fusionsprotein nahezu vollständig extrahiert worden war. Eine weitere Aufreinigung war somit nicht mehr notwendig. Die Analyse der Wasch- und Nachspülpuffer (B) zeigt, dass beim Waschen der beladenen Säule mit PBS und Hochsalz-Puffer (Spur 1 und 2) kein Fusionsprotein ausgespült wurde. Beim Waschen der eluierten Säule mit Glycinpuffer (Spur 3) wurden jedoch noch geringe Mengen PST-MycHis-Fusionsprotein von der Säule abgelöst (Immunpräzipitation von 1,5 ml aus 10 ml Gesamtvolumen, im Vergleich zu A, Spur 1: 1,5 ml von 1 Liter Gesamtvolumen). In der Analyse der Fraktionen (C und D) kann man eindeutig die Vorteile dieser Aufreinigungsmethode gegenüber der mit vorheriger Ankonzentrierung (siehe III 5.1) erkennen. Nur ein minimaler Anteil des Fusionsproteins, der nur im Western Blot in der konzentriertesten Fraktion (C, Spur 5) darzustellen war, lag hier degradiert vor. Damit stand nun eine geeignete Methode zur Aufreinigung von MycHis-Fusionsproteinen zur Verfügung.

III 6 Charakterisierung des PST-MycHis-Fusionsproteins

Das wie unter III 5.2 beschrieben aufgereinigte PST-MycHis-Fusionsprotein wurde nun weitergehend charakterisiert. Ziel dieser Untersuchungen war unter anderem die Bestimmung der Anzahl der N-Glykane in der PST und die weitere Analyse der Disulfidbrückenstruktur.

III 6.1 Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF

PST besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen die erste (Asparagin⁵⁰) für die Aktivität des Enzyms nicht notwendig ist, da die PST-Verkürzung PST59 in ihren katalytischen Fähigkeiten dem Wildtypenzym entspricht (siehe III 3). Mutagenesestudien zur Bedeutung der restlichen fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen wurden parallel zu dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Abspaltung der N-Glykane vom PST-MycHis-Fusionsprotein mit PNGaseF sollte nun eine Abschätzung der Anzahl der in der PST bedienten N-Glykosylierungsstellen geben. Zudem war es mit Hinblick auf die Analyse der Disulfidbrücken unter Umständen notwendig, das Protein vorher zu deglykosylieren. In Abb. 41A ist der Verdau des PST-MycHis-Fusionsproteins mit Exoneuraminidase und PNGaseF gezeigt. Dazu wurden 15 µl der Hauptfraktion einer PST-MycHis-Aufreinigung mit 1 µl Exoneuraminidase versetzt (II 2.3.9), 30 min verdaut und nach der Zugabe von 1,5 U PNGaseF weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert (II 2.3.10). Zu mehreren Zeitpunkten innerhalb des

4stündigen PNGaseF-Verdau wurden Aliquots à 1,5 µl entnommen und im Western Blot mit 9E10 analysiert.

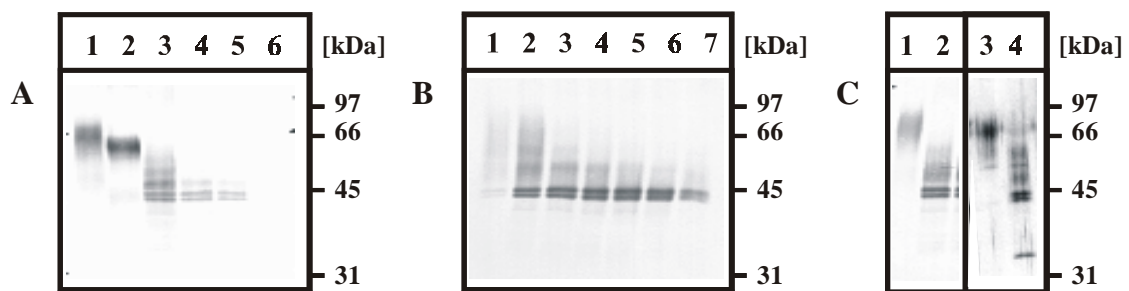


Abb. 41: Analyse der PNGaseF-Verdau des PST-MycHis-Fusionsproteins im Western Blot. A) PNGaseF-Verdau (4 Stunden) mit vorherigem Exoneuraminidase-Verdau (30 min) 1) unverdaute Probe 2) Aliquot nach Exoneuraminidase-Verdau 3) Aliquot nach 5minütigem PNGaseF-Verdau 4) Aliquot nach 1stündigem PNGaseF-Verdau 5) Aliquot nach 2stündigem PNGaseF-Verdau 6) Aliquot nach 4stündigem PNGaseF-Verdau B) PNGaseF-Verdau (1 Stunde) 1) Aliquot direkt nach PNGaseF-Zugabe 2) Aliquot nach 1 min 3) Aliquot nach 5 min 4) Aliquot nach 15 min 5) Aliquot nach 30 min 6) Aliquot nach 45 min 7) Aliquot nach 1 Stunde C) PNGaseF-Verdau (45 min) 1) unverdaute Probe 2) verdaute Probe 3) und 4) wie 1 und 2, nur Analyse im Silbergel.

Der Exoneuraminidase-Verdau führte zu einer Gewichtsreduktion des PST-Fusionsproteins auf ca. 60 kDa und zu einer Fokussierung der Bande (A, Spur 2). Nach dem Exoneuraminidase-Verdau wird zudem eine schwache Bande bei 45 kDa sichtbar, welche der unglykosylierten PST entspricht. Bereits nach 5minütigem PNGaseF-Verdau ist die Ausgangsbande der PST bei ca. 60 kDa verschwunden und ein komplexeres Bandenmuster tritt auf (A, Spur 3). Das Hauptprodukt stellt sich als Doppelbande bei ca. 45 kDa dar und ist auf die deglykosylierte Form der PST zurückzuführen. Oberhalb dieser Bande lassen sich mindestens drei weitere Banden zwischen dem Ausgangsmaterial und dem deglykosylierten Protein zuordnen, was einer Mindestanzahl von vier bedienten N-Glykosylierungsstellen entspricht. Mit fortschreitender Inkubationszeit verstärkt sich die Doppelbande bei gleichzeitigem Rückgang der Gesamtproteinmenge. In dem in Abb. 41B abgebildeten Experiment wurden mehrere Aliquots innerhalb eines einstündigen Verdau entnommen. Schon nach 1 min lag fast das gesamte Protein deglykosyliert vor. Auch in diesem Verdau stellt sich das verdaute Protein als Doppelbande dar. Die Ursache dafür ist unbekannt. In Abb. 41C ist ein 45minütiger PNGaseF-Verdau (240 µl-Ansatz) im Vergleich zur Ausgangsprobe im Western Blot (Spuren 1 und 2) und im Silbergel (Spuren 3 und 4) dargestellt. Im Silbergel erkennt man in der verdauten Probe (Spur 4) zusätzlich zu den PST-Banden die PNGaseF-Bande bei 34 kDa. Der Verdau war in diesem Fall nicht vollständig. Zur Konzentrationsbestimmung des deglykosylierten PST-MycHis-Fusionsproteins wurde ein kleiner Ansatz (5 µl) im Silbergel mit verschiedenen Mengen Vergleichsprotein (BSA: 1 ng bis 1 µg) aufgetrennt (Abb. 42).

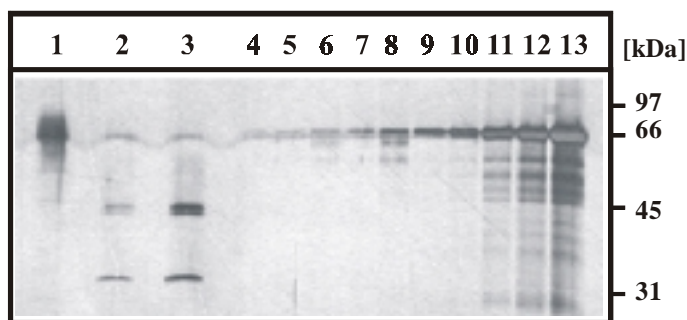


Abb. 42: Konzentrationsbestimmung des deglykosylierten PST-MycHis-Fusionsproteins. 1) 1,5 µl unverdaute PST 2) 1,5 µl deglykosylierte PST 3) 3 µl deglykosylierte PST 4) 1 ng BSA 5) 2 ng BSA 6) 4 ng BSA 7) 8 ng BSA 8) 20 ng BSA 9) 40 ng BSA 10) 80 ng BSA 11) 200 ng BSA 12) 400 ng BSA 13) 1 µg BSA.

Dieser Verdau war nahezu vollständig. Auch hier ist in den verdauten Proben (Spuren 2 und 3) die Bande der PNGaseF deutlich zu erkennen. Die PST-Doppelbande nach der Deglykosylierung in der konzentrierteren Probe (Spur 3) ist ungefähr mit der Bande von 40 ng BSA zu vergleichen, was einer PST-Konzentration von ca. 15 ng/µl oder ca. 0,5 pmol/µl entspricht. Die Abschätzung der PST-Proteinmenge über den Vergleich mit der eingesetzten Menge an PNGaseF ergibt ähnliche Werte.

III 6.2 Alkylierung mit ABDF

Durch Alkylierung mit ABDF lassen sich Thiol-Gruppen, und somit freie Cysteine nachweisen. Durch Reaktion dieser Cysteine mit ABDF entstehen sehr stabile Konjugate, die unter UV-Licht fluoreszieren. Durch vorherige oder gleichzeitige Reduktion des Proteins lassen sich dann Aussagen über die Anzahl der Disulfidbrücken treffen. Zur Überprüfung des PST-MycHis-Fusionsproteins wurde dieses, wie in II 2.3.11 beschrieben, mit und ohne Reduktion durch TCEP mit ABDF alkyliert und in der SDS-PAGE analysiert. Abb. 43 stellt das Gel einmal unter UV-Licht (B) und zum anderen mit Roti-Blue gefärbt (A) dar. Spuren 1 bis 3 zeigen Beispielreaktionen mit bovinem Serumalbumin (BSA), das 17 Disulfidbrücken und ein freies Cystein enthält. In Spur 1 wurde BSA nur alkyliert, in Spur 2 wurde gleichzeitig reduziert und alkyliert und Spur 3 enthält das zuvor bei 60°C reduzierte und dann alkylierte BSA. Die Intensitätszunahme des Fluoreszenzsignals durch Reduktion des Proteins ist gut zu erkennen (B, Spur 1 und 2). Die vorherige Reduktion bei erhöhter Temperatur führte zu einer weiteren Verstärkung des Signals (Spur 3). Durch die Doppelbande, die nach der Reduktion des BSA im gefärbten Gel zu erkennen ist, wird deutlich, dass die Reduktion nicht vollständig abgelaufen war und dass reduziertes BSA geringfügig andere Laufeigen-

schaften im Gel aufweist. In Spur 4 ist der alkylierte niedermolekulare Marker aufgetragen. Im Vergleich mit dem gefärbten Gel wird deutlich, dass die Markerbande der Kohlensäuredehydrase bei 31 kDa nicht fluoreszenzmarkiert wurde, da dieses Enzym kein Cystein besitzt. Die entsprechenden Experimente wurden ebenfalls mit dem PST-MycHis-Fusionsprotein durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Spuren 5, 6 und 7 und für das deglykosylierte Protein in Spuren 8, 9 und 10 dargestellt. Obwohl das Signal aufgrund der geringen Proteinmenge sehr schwach ist, erkennt man trotzdem sowohl für das glykosylierte als auch für das deglykosylierte Protein eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität durch Reduktion (vgl. Spuren 5 und 6/7 sowie 8 und 9/10). Geht man davon aus, dass von den sechs in dem PST-MycHis-Fusionsprotein enthaltenen Cysteinen eines (Cystein⁴³) auf jeden Fall nicht in einer Disulfidbrücke eingebunden ist, so bleiben fünf Cysteine übrig, von denen höchstens vier Disulfidbrücken ausbilden können. Das Fluoreszenzsignal der nicht-reduzierten PST wurde demnach von mindestens zwei Cysteinen verursacht. Ob das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten vor und nach der Reduktion eher 2:6 (2 Disulfidbrücken) oder 4:6 (1 Disulfidbrücke) beträgt, kann hier nicht zweifelsfrei geklärt werden. Die Interpretation der Alkylierungsexperimente legt allerdings die Existenz von zwei Disulfidbrücken in der PST nahe. In der Auftrennung der deglykosylierten Proben erkennt man zusätzlich zur PST bei 34 kDa die Bande der PNGaseF, die nativ drei Disulfidbrücken aufweist.

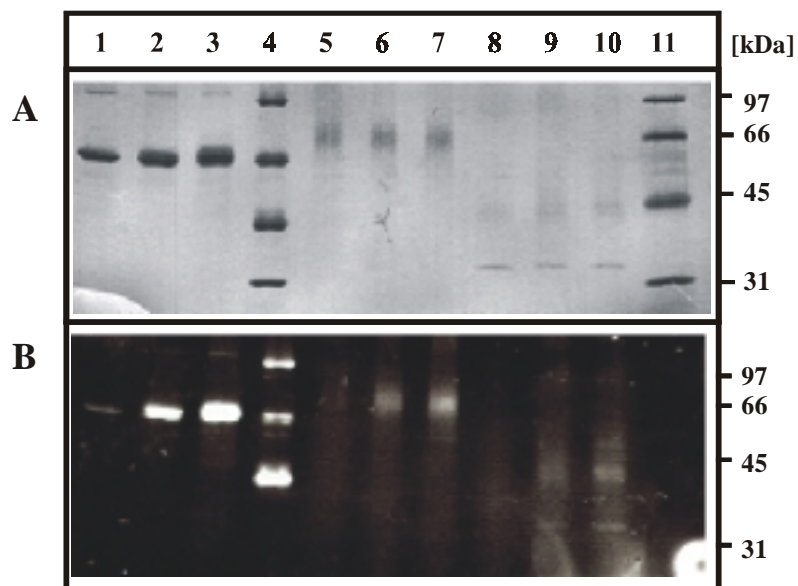


Abb. 43: Alkylierung von BSA und PST-MycHis mit ABDF. Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE. 1) BSA 2) BSA (gleichzeitige Reduktion mit TCEP) 3) BSA (vorherige Reduktion mit TCEP) 4) Marker (ebenfalls alkyliert und reduziert) 5) PST-MycHis 6) PST-MycHis (gleichzeitige Reduktion mit TCEP) 7) PST-MycHis (vorherige Reduktion mit TCEP) 8) PST-MycHis deglykosyliert 9) PST-MycHis deglykosyliert (gleichzeitige Reduktion mit TCEP) 10) PST-MycHis deglykosyliert (vorherige Reduktion mit TCEP) 11) Marker (nicht alkyliert) A) Detektion unter UV-Licht B) Roti-Blue-Färbung.

III 6.3 Proteolytische Spaltung mit Trypsin und Chymotrypsin

In Zusammenarbeit mit der Firma BioVisioN in Hannover wurde das Projekt in Angriff genommen, die Disulfidbrücken der PST durch proteolytischen Verdau und anschließende Analyse der Fragmente durch Massenspektrometrie und Proteinsequenzierung zu identifizieren. Es wird nun im folgenden ein kurzer Überblick über den Verlauf dieser Kooperation gegeben. Da die Experimente ausschließlich von BioVisioN durchgeführt wurden, wird auf die nähere Beschreibung der Versuchsbedingungen verzichtet. Zur Überprüfung des Ausgangsmaterials wurde das PST-MycHis-Fusionsprotein im Massenspektrometer (MALDI) analysiert. Es ergab sich ein sehr heterogenes Signal für das Fusionsprotein im Massenbereich zwischen 52 und 62 kDa mit der Hauptintensität bei 56 kDa. Es wurden aber auch mehrere Signale im niedermolekularen Bereich detektiert, die von Verunreinigungen in der Probe stammen. Die ersten Proteaseverdau wurde mit glykosyliertem und deglykosyliertem PST-MycHis-Fusionsprotein durchgeführt. Vor dem Verdau mit Trypsin und mit Chymotrypsin wurde das Fusionsprotein über HPLC von der PNGaseF und sonstigen Verunreinigungen getrennt. Die Analyse der proteolytischen Fragmente im MALDI direkt und nach der Rechromatographie über HPLC ergab keine allein durch ihre Größe zu identifizierenden Proteinbruchstücke. Für die Sequenzierung der erhaltenen Fragmente war nicht mehr genügend Material vorhanden. Es zeigte sich aber, dass auch glykosyliertes Material verwendet werden kann und die Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF nicht zu einer Verbesserung der Proteaseverdau, sondern im Gegenteil eher zu erhöhten Proteinverlusten führte. Zudem lieferte der Verdau mit Chymotrypsin eindeutig bessere Resultate und ist auch aufgrund der theoretisch entstehenden Fragmente zu bevorzugen. Ein erneuter Verdau der glykosylierten PST mit Chymotrypsin ergab jedoch auch keine eindeutig zuzuordnenden Fragmente.

IV DISKUSSION

Über die molekularen Voraussetzungen, die den eukaryontischen Polysialyltransferasen die Ausbildung der aktiven Konformation und die Katalyse ermöglichen, lagen zu Beginn dieser Arbeit kaum experimentelle Daten vor. Es war lediglich bekannt, dass terminal galaktosylierte N-Glykane der PST für deren Fähigkeit, NCAM und sich selbst zu polysialylieren, essentiell sind [145]. Neuere Studien bestätigen die Beteiligung der N-Glykane am Katalysemechanismus [146,147]. Welche der sechs (PST) bzw. sieben (STX) potentiellen N-Glykosylierungsstellen jedoch für die Aktivität ausschlaggebend ist oder sind, wird zur Zeit heftig diskutiert [147,174]. Für ein anderes Enzym aus der Gruppe der Sialyltransferasen, die ST6Gall, waren bereits essentielle Aminosäuren identifiziert worden [78,79]. Diese Studien weisen dem L-Sialylmotiv eine Beteiligung an der Bindung des Donor-Substrates und dem S-Sialylmotiv eine Funktion bei der Bindung von Donor- sowie Akzeptor-Substrat zu. Weiterhin wurde postuliert, dass zwei hochkonservierte Cysteine, von denen eines im L- und eines im S-Sialylmotiv lokalisiert ist, eine Disulfidbrücke ausbilden [79,175].

Das Ziel dieser Arbeit war es, essentielle Bereiche oder Aminosäuren in den Polysialyltransferasen zu identifizieren und diese dann mit den katalytischen Fähigkeiten in Zusammenhang zu bringen. Zur Realisierung dieses Projektes wurden drei Ansätze verfolgt. Eine Möglichkeit, um an der PSA-Synthese beteiligte Aminosäuren aufzuspüren, bot die molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10, die aus chemisch mutagenisierten CHO-K1-Zellen isoliert worden war [137]. Alle 31 Klone dieser Gruppe weisen einen Defekt im PST-Gen auf, der für ihren PSA-negativen Phänotyp verantwortlich ist. Die Identifizierung dieser für die PST lethalen Mutationen erfolgte durch RT-PCR und Sequenzierung der amplifizierten cDNAs. Eine weitere Möglichkeit, Struktur-Funktionsbeziehungen der Polysialyltransferasen zu untersuchen, bietet das gezielte Einfügen von Mutationen in die Wildtypsequenz und die anschließende Analyse der rekombinant hergestellten, mutierten Proteine. Zusätzlich zu Punktmutanten wurden N- und C-terminale Verkürzungen der PST auf ihre Funktion untersucht. In einem dritten Ansatz wurden die Wildtypproteine, welche dazu in größeren Mengen rekombinant hergestellt wurden, durch chemische Modifikation oder enzymatischen Verdau näher charakterisiert.

IV 1 Molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10

Die molekulare Analyse der Komplementationsgruppe 2A10 umfasste die Untersuchung aller 31 Subklone auf Expression von PST-mRNA im Northern Blot und in der RT-PCR, sowie die Sequenzierung der amplifizierten PST-cDNAs. Um sicherzustellen, dass die so detektierten Mutationen in den cDNAs für den Funktionsverlust der PST auf zellulärer Ebene verantwortlich sind, wurden identische Aminosäureaustausche in die Wildtypsequenz der PST eingefügt und die rekombinant hergestellten Mutanten *in vivo* und *in vitro* auf ihre Aktivität getestet. Parallel wurden entsprechende STX-Mutanten hergestellt und ebenfalls analysiert.

IV 1.1 Expression von PST-mRNAs

Da PST-mRNA in CHO-Zellen sehr schwach exprimiert wird, konnte ein Signal im Northern Blot nur erhalten werden, wenn zweifach aufgereinigte mRNA (poly(A⁺)-RNA) verwendet wurde. Poly(A⁺)-RNA zeichnet sich durch sehr geringe Verunreinigungen mit ribosomaler RNA (rRNA) aus (siehe Abb. 8, Seite 48, rRNA-Banden bei ca. 4,4 und 1,8 kb). CHO-Wildtypzellen zeigten mit einer PST-spezifischen RNA-Sonde ein Hybridisierungsmuster, welches aus einem Hauptsignal bei 6,5 kb und einem schwächeren Signal bei 2,2 kb besteht. Frühere Northern Blot-Analysen in unserer Arbeitsgruppe zeigten für CHO-Zellen ein Hybridisierungssignal bei 5,2 kb [137]. Ein Signal entsprechender Größe konnte im Verlauf dieser Arbeit in sieben unabhängigen Experimenten nicht detektiert werden. Studien an menschlichen Geweben dagegen wiesen dem humanen PST-Transkript ebenfalls eine Größe von 6,5 kb zu [140,152]. Teilweise wurde zusätzlich eine Bande bei ca. 3,7 kb detektiert. Neuere Studien in unserer Arbeitsgruppe, die mit fötalem humanem Gesamtgehirn durchgeführt wurden, zeigten für das PST-Transkript ebenfalls eine Größe von ca. 6,8 kb [176]. Für die Maus liegen unterschiedliche Daten über die Größe der PST-mRNA vor. Einige Studien weisen den PST-Transkripten eine Größe von ca. 5 kb zu [138], andere Studien jedoch zeigen Hybridisierungssignale bei 6,5 kb [151]. Für die Ratte liegen ebenso widersprüchliche Daten vor. Eine Studie, die mit Hippocampus aus verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt wurde, detektiert ein Signal im Northern Blot bei ca. 5 kb [177]. Eine andere Studie weist jedoch der PST-mRNA aus dem Gesamtgehirn der Ratte eine Größe von ca. 6,5 kb nach [178]. Insgesamt kann man sagen, dass bis jetzt nur für das humane PST-Transkript einheitliche Daten bezüglich der Größe vorliegen (6,5 bis 6,8 kb). Für die PST-mRNA aus Hamster, Ratte und Maus werden zwei Größen, 5 und 6,5 kb, diskutiert.

Die Northern Blot-Analyse bestätigte nur für fünf von insgesamt 31 Klonen die Existenz von PST-Transkripten (Abb. 9, Seite 49). Lediglich bei einem Klon (7G11) war das Hybridisierungsmuster mit dem Wildtyp identisch. Von den übrigen vier Klonen exprimierten drei Klone (2A10, 2B12, 9C8) deutlich weniger PST-mRNA als der Wildtyp und ein Klon (8F8) ein verkürztes PST-Transkript mit einer Größe von 6,1 kb. Aufgrund der gesteigerten Sensitivität der RT-PCR gegenüber dem Northern Blot war es möglich, aus weiteren fünf Klonen (2D8, 4C4, 5C3, 7F11, 9D8) PST-mRNA in cDNA umzuschreiben und zu amplifizieren. Die Tatsache, dass für 21 Klone keine Expression von PST-Transkripten nachgewiesen werden konnte, lässt sich durch Mutationen, die entweder den Promotorbereich der PST betreffen oder die mRNA-Stabilität drastisch herabsetzen, erklären.

IV 1.2 Defekte in PST-cDNAs

Die Sequenzierung der PST-cDNAs aus 10 2A10-Klonen ermöglichte in neun Fällen die Identifikation von Punktmutationen, die sich alle in der Aminosäuresequenz auswirken, und in einem Fall (8F8) die Zuordnung einer Deletion, die das gesamte Exon 3 betrifft. In zwei Klonen (2A10, 2B12) führt ein identischer Nukleotidaustausch (*C103T*) zu einem frühzeitigen Stop-Kodon. Das resultierende Protein würde nach der 34. Aminosäure enden. Da beide Klone zudem aus einem Mutageneseexperiment hervorgegangen sind, handelt es sich mit höchster Wahrscheinlichkeit um identische Klone. Eine weitere Mutation ist ebenfalls in zwei Klonen (4C4 und 7F11) nachgewiesen worden. In diesem Fall waren beide Klone aus unterschiedlichen Mutageneseansätzen hervorgegangen. In zwei Klonen (2D8 und 9D8) wurden jeweils zwei Punktmutationen nachgewiesen. Die übrigen drei Klone weisen je einen singulären Nukleotidaustausch auf. Eine Übersicht über den Verlauf der Analyse der Komplementationsgruppe 2A10 ist in Abb. 13 auf Seite 53 dargestellt. Bei den betroffenen Aminosäuren handelt es sich mit zwei Ausnahmen (Valin²³⁰, Cystein³⁵⁶) ausschließlich um Positionen, die entweder in der Nähe eines Sialylmotives lokalisiert oder direkt Bestandteil eines Motives sind. Der Vergleich mit anderen Sialyltransferasen bestätigt die hohe Konservierung der durch 2A10-Mutationen betroffenen Aminosäuren (Abb. 15, Seite 55).

IV 2 Einfluss ausgewählter Aminosäuren auf die Struktur und Funktion von PST und STX

Da die Deletion von Exon 3 in Klon 8F8 und die frühzeitige Stop-Mutation (Q35stop) in den Klonen 2A10 und 2B12 in den potentiellen Proteinen den Verlust eines Großteil des L-Sialylmotives bzw. den nahezu kompletten Verlust der katalytischen Domäne und somit

offensichtlich die Zerstörung der katalytischen Fähigkeiten bedingen würde, wurden diese Mutationen nicht näher analysiert. Die übrigen 2A10-Mutationen wurden einzeln in die Wildtypsequenzen von Hamster-PST und Maus-STX eingefügt. Dabei wurden alle Mutanten zur rekombinanten Expression zum einen in löslicher Form als MycHis-Fusionsproteine und zum andern membranständig als FlagHA-Fusionsproteine hergestellt. Zudem wurden weitere Mutationen und Deletionen, die im Rahmen der Analyse der Komplementationsgruppe 2A10 interessant erschienen, in die lösliche Form des PST-Wildtyps eingefügt. Die rekombinant hergestellten Mutanten wurden daraufhin *in vivo* und *in vitro* auf ihre Polysialylierungsaktivität getestet. Die Varianten mit 2A10-Mutationen wurden zusätzlich auf ihre intrazelluläre Lokalisation überprüft. Im folgenden Abschnitt werden nun die in dieser Arbeit untersuchten Positionen in ihrer Abfolge vom N- zum C-Terminus hin aufgeführt, mit anderen Sialyltransferasen verglichen (siehe Anhang VI 2) und ihre Bedeutung für die Aktivität und Struktur der Polysialyltransferasen anhand der Mutanten beschrieben. In Abb. 44 sind alle in diesem Abschnitt aufgeführten Aminosäuren mit Hinblick auf ihre Lage im PST-Protein zusammengefasst dargestellt.

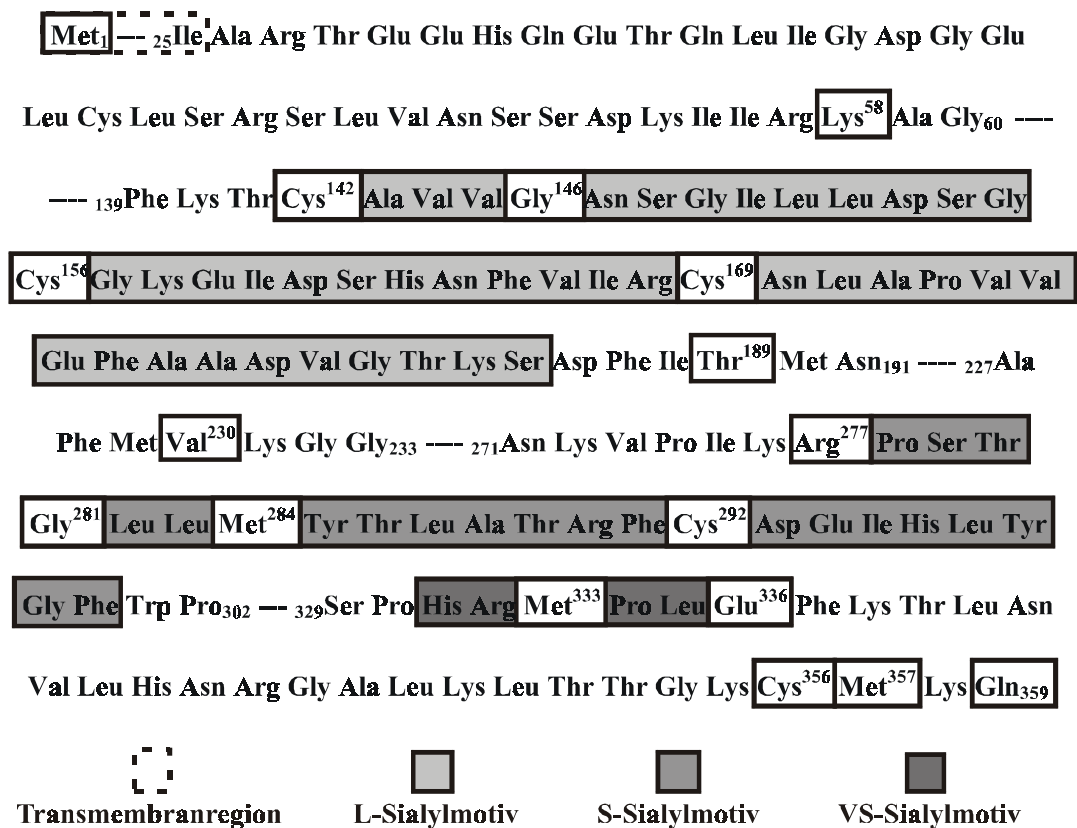


Abb. 44: Darstellung aller im Abschnitt IV 2 aufgeführten Mutationen und ihrer Lage im PST-Protein unter Berücksichtigung der Sialylmotive L, S und VS.

IV 2.1 Aktivitätsprofile und Vergleich der rekombinant hergestellten PST und STX

Die in den Zellkulturüberstand von transient transfizierten 2A10-Zellen sekretierten und daraus isolierten MycHis-Fusionsproteine zeigten *in vitro* die für Polysialyltransferasen charakteristischen (siehe dazu [145]) Signale für Auto- und NCAM-Polysialylierung (III 2.3, Abb. 19 bis Abb. 23, A/B). Der Molekulargewichtszuwachs der PST kann durch die Autopolysialylierung über 150 kDa betragen, was einem Polymer aus über 450 Sialinsäuren entspricht. STX ist dagegen mit PSA-Ketten, die aus bis zu 150 Monomeren bestehen, weitaus weniger prozessiv (ca. 50 kDa Molekulargewichtszunahme durch Autopolysialylierung). Frühere Studien haben gezeigt, dass PST und STX auch *in vivo* autopolysialyliert vorliegen [145,146]. Es wurde zudem gezeigt, dass in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen PST auch *in vivo* deutlich längere PSA-Ketten synthetisiert [146]. Die Molekulargewichtszunahme betrug dabei für PST bis zu 130 kDa und für STX maximal 60 kDa. Es gibt allerdings auch neuere Arbeiten, in denen der Unterschied zwischen PST und STX bezüglich der Autopolysialylierung *in vitro* nicht so deutlich ausfällt [148]. Der Unterschied in der Prozessivität von PST und STX wirkt sich auch auf die NCAM-Polysialylierung aus. PST führte in allen Experimenten zu einer Molekulargewichtserhöhung des ProteinA-NCAMs (150 kDa) auf deutlich über 220 kDa, wohingegen bei STX der Gewichtszuwachs auf Werte zwischen 50 und 100 kDa begrenzt war. Die Tests auf NCAM-Polysialylierung *in vitro* verdeutlichen erneut die Unterschiede beider Enzyme in der Autopolysialylierung, welche immer als Nebenreaktion beobachtet wurde. Im Fall der PST lassen sich die polysialylierten Produkte in der SDS-PAGE nicht dissoziieren, da sich aufgrund der starken autokatalytischen Inkorporation von radioaktiver Sialinsäure die Signale für PSA-tragende PST mit denen des polysialylierten NCAMs überlagern. Erst nach dem Verdau mit Endo NE kann man beide Proteine eindeutig unterscheiden. Für STX jedoch lassen sich die Signale für polysialyliertes Enzym und polysialyliertes NCAM auch ohne Neuraminidase-Verdau zuordnen. Die japanische Arbeitsgruppe von S. Tsuji zeigte schon 1996 bzw. 1997 durch den qualitativen Vergleich der *in vitro*- und *in vivo*-Aktivitäten beider Enzyme aus der Maus, dass PST deutlich längere PSA-Ketten an NCAM synthetisiert als STX [179,180]. Identische Beobachtungen wurden in Aktivitätstest mit humanen Polysialyltransferasen und NCAM-Mutanten, die entweder nur die 5. oder nur die 6. N-Glykosylierungsstelle besaßen, gemacht [156]. PST übertrug dabei *in vitro* durchschnittlich 50 Sialinsäuremonomere auf seinen Akzeptor, STX dagegen nur 10 bzw. 20.

Ein weiterer Unterscheid zwischen PST und STX besteht im Expressionsverhalten (siehe III 2.3, Abb. 19 bis Abb. 23, C/D). Insgesamt wurde STX von transfizierten Zellen besser synthetisiert und sekretiert. Zudem waren die Schwankungen in der Expressionshöhe in verschiedenen Experimenten bei STX nicht so ausgeprägt wie bei PST. In allen Experimenten ließ sich intrazellulär die unglykosylierte Form der Polysialyltransferasen bei ca. 41 kDa sowie die im Reifungsprozess befindlichen, nicht vollständig glykosylierten Proteine nachweisen. Für STX konnte man dabei bis zu fünf, bei PST dagegen hauptsächlich nur zwei und manchmal drei Zwischenformen im Bereich zwischen 50 und 60 kDa zuordnen. Die sekretierten Polysialyltransferasen wiesen ein Molekulargewicht zwischen 60 und 70 kDa auf. In einer Studie, in der PST metabolisch markiert, aus Zellysaten immunpräzipitiert und im SDS-Gel analysiert wurde, konnten neben der Bande mit der vollständig glykosylierten PST ebenfalls nur zwei Nebenbanden nachgewiesen werden [147].

Ein weiterer Unterschied zwischen PST und STX wurde in der Immunfluoreszenz deutlich (siehe III 2.4). Für PST war die eindeutige Zuordnung zum Golgi-Kompartiment möglich, für STX dagegen war die Deutung der Ergebnisse schwieriger. In beiden Fällen konnte man Zellen nachweisen, die aufgrund der Überexpression des rekombinanten PST- bzw. STX-Fusionsproteins dieses auch im Endoplasmatischen Retikulum aufwiesen. Für PST war es dabei kein Problem, auch weniger stark transfizierte Zellen zu finden, welche eindeutige Golgi-Färbungen zeigten. Bei STX jedoch war der Anteil dieser Zellen so stark verringert, dass in einigen Experimenten keine geeigneten Zellen identifiziert werden konnten. Die Variation der Transfektionsbedingungen brachte keine Verbesserung. Durch Doppelfärbung mit anti-STX-Antikörpern wurde sichergestellt, dass es sich bei den ER-Signalen um STX-spezifische Anfärbungen handelte. Eine Ursache für diese Phänomene könnte das deutlich bessere Expressionsverhalten der STX im Vergleich zur PST sein. Die Konsequenz wäre dann, dass alle Zellen, die Plasmid-DNA aufgenommen haben, das entsprechende STX-Protein überexprimieren.

IV 2.2 Methionin¹ - Lysin⁵⁸ (PST) / Methionin¹ - Asparaginsäure⁶⁹ (STX)

Der N-Terminus der PST weist nur geringe Homologie zu dem anderer Sialyltransferasen auf. STX z.B. enthält in diesem Bereich 15 zusätzliche Aminosäuren, die je nach Sequenzvergleich unterschiedlichen Positionen zugeordnet werden. Frühere Studien in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die ersten 26 Aminosäuren der PST [145] und die ersten 70 Aminosäuren der STX [181] für die katalytische Aktivität des jeweiligen Enzyms nicht notwendig sind. Aus Homologieerwägungen und zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse beginnen

die in dieser Arbeit verwendeten löslichen MycHis-Fusionsproteine direkt hinter der Transmembrandomäne (PST: Alanin²⁶, STX: Isoleucin³²). Unter den ersten 58 Aminosäuren der PST befinden sich zwei nicht-konservierte Cysteine (Cystein¹¹, Cystein⁴³), von denen das erste innerhalb der Transmembranhelix lokalisiert ist, und die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asparagin⁵⁰). Die PST-Verkürzungen wurden so gewählt, dass in einem Konstrukt die ersten beiden Cysteine (pPST44: Deletion Methionin¹ bis Cystein⁴³) fehlen und im anderen Konstrukt zusätzlich die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle (PST59: Deletion Methionin¹ bis Lysin⁵⁸) deletiert wurde. Auch das kürzeste PST-Konstrukt (PST59) besaß volle katalytische Aktivität. Andere Arbeitsgruppen benutzten für ihre *in vitro*-Aktivitätstests ebenfalls lösliche Formen von PST und STX. Die amerikanische Gruppe um M. Fukuda z.B. verwendete die um die ersten 39 Aminosäuren verkürzte humane PST [157] und humane STX, der die ersten 32 Aminosäuren fehlten [156].

IV 2.3 Cystein¹⁴² (PST)

Cystein¹⁴² ist Bestandteil des L-Sialylmotives und in der gesamten Gruppe der Sialyltransferasen hoch konserviert. Schon mehrfach wurde die Beteiligung dieses Cysteins an einer intramolekularen Disulfidbrücke postuliert, der eindeutige Beweis gelang jedoch bis heute nicht [79,175]. Die in dieser Arbeit untersuchte Mutante PST/C142A ließ sich weder in 2A10-Zellen noch in COS-Zellen rekombinant herstellen (siehe Abb. 35, Seite 82). Durch die Mutation wurden demnach erhebliche Veränderungen in der Struktur der PST ausgelöst, die eine sofortige Degradation des fehlgefalteten Proteins bewirkten. Eine Ursache für derartig starke Strukturveränderungen kann der Verlust einer Disulfidbrücke sein. Für die α 2,6-Sialyltransferase war es jedoch möglich, die entsprechende Mutante (ST6GalI/C181A) in COS-Zellen zu exprimieren. Da ihre enzymatische Aktivität jedoch unter 5% der des Wildtyps lag, wurde sie bezüglich ihrer kinetischen Eigenschaften dort nicht eingehender untersucht [78].

IV 2.4 Glycin¹⁴⁶ (PST) / Glycin¹⁶¹ (STX)

Diese Aminosäure ist in der gesamten Gruppe der Sialyltransferasen hoch konserviert und Bestandteil des L-Sialylmotives, welches für die Bindung des Donor-Substrates CMP-Neu5Ac verantwortlich ist [78]. Lediglich in der ST6GalI und in einigen Enzymen der ST6GalNAc-Familie (III, IV, V) ist an dieser Position eine andere Aminosäure mit kleiner ungeladener Seitenkette (Threonin in der Maus-ST6GalNAcV, Serin in den übrigen Enzymen) zu finden (siehe dazu im Anhang VI 2). In der PST aus den 2A10-Klonen 4C4 und 7F11, ist Glycin¹⁴⁶ durch Glutaminsäure, eine Aminosäure mit großer geladener Seitenkette

ausgetauscht. Die rekombinant hergestellten Mutanten PST/G146E und STX/G161E waren trotz korrekter intrazellulärer Lokalisation (siehe III 2.4) und Expression auf Wildtypniveau weder in der membranständigen noch in löslicher Form in der Lage *in vivo* oder *in vitro* PSA zu synthetisieren (Abb. 17/Abb. 18, Seite 60/60 und Abb. 21/Abb. 23, Seite 64/66). Bei dieser Aminosäure handelt es sich somit um eine für die katalytische Aktivität beider Enzyme essentielle Aminosäure, die jedoch an der Ausbildung der Struktur und dem intrazellulären Targeting der Enzyme nicht maßgeblich beteiligt ist.

IV 2.5 Cystein¹⁵⁶ (PST) / Cystein¹⁶⁹ (PST)

Diese beiden Cysteine sind im Gegensatz zu Cystein¹⁴² trotz ihrer Lage innerhalb des L-Sialylmotives nur in der Gruppe der α 2,8-Sialyltransferasen konserviert. Die Mutanten PST/C156A und PST/C169A zeigten jedoch die gleichen Beeinträchtigungen wie PST/C142A. Sie ließen sich in 2A10- und in COS-Zellen nicht exprimieren (siehe Abb. 35, Seite 82). Der Austausch eines dieser beiden Cysteine gegen Alanin zieht demnach ebenso drastische Strukturveränderungen nach sich, wie der schon beschriebene Austausch des hochkonservierten Cystein¹⁴². Man kann daher annehmen, dass auch diese beiden Cysteine an Disulfidbrücken beteiligt sind.

IV 2.6 Threonin¹⁸⁹ (PST) / Threonin²⁰⁴ (STX)

Dieses drei Positionen C-terminal vom L-Sialylmotiv gelegene Threonin ist in allen bis jetzt bekannten α 2,8-Sialyltransferasen an entsprechender Position vorhanden. Sialyltransferasen anderer Spezifität zeigen für diese Position nur wenig ausgeprägte Präferenzen bezüglich der Seitenkette. Es kommen sowohl kleine und große hydrophobe (Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin) als auch große polare Seitenketten (Methionin) vor (siehe VI 2). In der PST des 2A10-Klons 7G11 ist Threonin¹⁸⁹ durch Isoleucin ersetzt. Die Mutanten PST/T189I und STX/T204I zeigten *in vivo* und *in vitro* keine katalytische Aktivität (Abb. 17/Abb. 18, Seite 60/60; Abb. 19/Abb. 22, Seite 62/65), obwohl sie in der Zelle richtig lokalisiert vorlagen (siehe III 2.4) und sich die Expression nicht vom Wildtyp unterschied. Dieser Befund ist recht erstaunlich, da z.B. die ST3GalIII an entsprechender Position ein Isoleucin aufweist. Diese Aminosäure kann somit trotz ihrer Nähe zum L-Sialylmotiv nicht für gemeinsame Funktionen von Sialyltransferasen, wie z.B. die CMP-Neu5Ac-Bindung, verantwortlich sein. Vielmehr wird es sich bei Threonin^{189/204} um eine Aminosäure handeln, die maßgeblich an der spezifischen Verknüpfung von α 2,8-glykosidischen Bindungen beteiligt ist.

IV 2.7 Valin²³⁰ (PST)

Diese zwischen dem L- und S-Sialylmotiv gelegene Aminosäure ist nur in der ST8SiaIV (PST) konserviert. ST8SiaII (STX) weist an entsprechender Position die sehr ähnliche Aminosäure Alanin auf. Neben Valin²³⁰ ist in der PST des 2A10-Klons 9D8 eine weitere Aminosäure, Arginin²⁷⁷, durch Mutation betroffen. Da diese 2A10-Mutation einen Austausch von Valin durch Alanin bewirkt, ist es nicht überraschend, dass sich die Mutante PST/V230A in den Aktivitätstest in jeglicher Hinsicht nicht vom Wildtyp unterschied. Die Doppelmutante PST/V230A/R277G zeigte entsprechend alle Charakteristika der Einzelmutante PST/R277G (dazu siehe IV 2.8). Für die Ausprägung des PSA-negativen Phänotyps des 2A10-Ursprungsklons 9D8, ist somit allein die Mutation Arginin²⁷⁷→Glycin verantwortlich.

IV 2.8 Arginin²⁷⁷ (PST) / Arginin²⁹² (STX)

Diese Aminosäure liegt direkt N-terminal vom S-Sialylmotiv und ist in allen α 2,8-Sialyltransferasen konserviert. Der Vergleich mit Sialyltransferasen anderer Spezifität zeigt, dass in diesem Bereich die Homologie sehr gering und deswegen eine genaue Zuordnung der äquivalenten Aminosäuren kaum möglich ist (siehe VI 2; Abb. 15, Seite 55). In einigen α 2,6-Sialyltransferasen fehlt z.B. eine dem Arginin²⁷⁷ entsprechende Aminosäure gänzlich. In der PST des 2A10-Klons 9D8 befindet sich nun an Position 277 anstelle des Arginins ein Glycin. Dieser Klon weist einen weiteren Aminosäureaustausch im PST-Protein auf, der sich aber nicht auf die Funktion des Enzyms auswirkt (V230A, siehe IV 2.7). Die Überexpression von TM-PST/R277G führte in 2A10-Zellen zu einer deutlichen, aber gegenüber dem Wildtyp weniger ausgeprägten Re-Expression von PSA auf den Zelloberflächen (Abb. 17, Seite 60). Auch durch Veränderung der Transfektionsbedingungen (Menge an DNA bzw. Transfektionsreagenz) ließ sich die PSA-Expression dieser Mutante nicht an die des Wildtyps angleichen (siehe III 2.5.1). Der Aktivitätstest zeigte, dass die Mutante PST/R277G unter *in vitro*-Bedingungen die Fähigkeit zur Autopolysialylierung fast vollständig verloren hatte, aber trotzdem noch in der Lage war, NCAM zu polysialylieren (Abb. 19, Seite 62). Zudem ließ sich die Autopolysialylierung *in vitro* durch die Gegenwart von NCAM reaktivieren. Entsprechend konnten an der Mutante PST/R277G auch *in vivo* PSA-Ketten nachgewiesen werden, wenngleich die Signale gegenüber dem Wildtyp in ihrer Intensität reduziert waren und auf ein geringeres Molekulargewicht der PSA-Ketten hinwiesen (siehe III 2.5.3). Das Aktivitätsprofil der entsprechenden STX-Mutante (STX/R292G) weicht nur geringfügig von dem der PST-Mutante ab. STX/R292G war im Gegensatz zur PST-Mutante nicht in der Lage,

in 2A10-Zellen die Oberflächenexpression von PSA zu induzieren (Abb. 17, Seite 60). Ein weiterer Unterschied zeigte sich im Vergleich der Signale für die Autopolysialylierung *in vitro*, die für STX/R299G deutlich schwächer als für PST/R277G ausfielen (Abb. 22, Seite 65). Dadurch dass STX im Vergleich zur PST das katalytisch nicht so aktive Enzym ist, welches zudem kürzere PSA-Ketten synthetisiert (siehe IV 2.1), lassen sich die für STX in allen Aktivitätstests schwächer ausfallenden Signale erklären. Die Kontrollen zeigten, dass beide Mutanten intrazellulär korrekt im Golgi lokalisiert waren (siehe III 2.4) und von 2A10-Zellen dem Wildtyp entsprechend synthetisiert und sekretiert wurden. Ein Austausch dieser Aminosäure (Arginin^{277/292}) wirkt sich damit weder auf die intrazelluläre Lokalisation und die Expression noch auf die Fähigkeit der Mutanten, *in vitro* NCAM zu polysialylieren, aus. Selektiv betroffen ist die Autopolysialylierung dieser Mutanten, die sich jedoch durch die Gegenwart von NCAM *in vitro* und *in vivo* partiell wieder reaktivieren lässt.

Alle Experimente, die die Aktivität der Polysialyltransferasen untersuchen, basieren auf artifiziellen Systemen. Die Enzymdichte oder die Nähe zwischen Enzym und Akzeptor ist in diesen Versuchen aufgrund der Überexpression nach Transfektion oder aufgrund der Immobilisierung nach Immunpräzipitation deutlich gegenüber der Normalsituation erhöht. Die einzige Ausnahme bildet die Situation im 2A10-Ursprungsklon, der keine Oberflächenexpression von PSA zeigt. Daraus kann man folgern, dass der unter Normalbedingungen zum Funktionsverlust des Enzyms führende Defekt (Arginin^{277/292}→Glycin) durch die räumliche Nähe der Mutante zu NCAM zum Teil korrigiert wird. Die enge Nachbarschaft der Mutanten untereinander reicht dazu allein jedoch nicht aus. In mehreren Studien wird die Bildung von Dimeren oder größeren Oligomeren postuliert, um die Golgi-Retention der Sialyltransferasen zu erreichen (zur Übersicht [81]). Für die α 2,6-Sialyltransferase wurde überdies das Dimer als katalytisch aktive Einheit nachgewiesen [182]. Die Frage, ob es sich dabei um ein kovalent verbundenes Dimer handelt, das in anderen Studien nachgewiesen wurde, dort aber inaktiv war [82], ist noch ungeklärt. Im Fall der Mutanten PST/R277G bzw. STX/R292G kann nun diese Fähigkeit zur Oligomerisierung gestört sein, sodass unter Normalbedingungen die Ausbildung des aktiven Komplexes ausbleibt. Die Golgi-Retention der Mutanten wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst. Andererseits können durch den Austausch des Arginins gegen die chemisch recht verschiedene Aminosäure Glycin auch geringfügige Konformationsänderungen im aktiven Zentrum des Enzyms die Polysialylierung unterbinden. In beiden Fällen ist jedoch möglich, durch den engem Kontakt zum Akzeptor NCAM die durch die Mutation ausgelösten Beeinträchtigungen zu kurieren, sodass die Mutante die gesamte Bandbreite ihrer katalytischen Fähigkeiten zurückgewinnt. Anhand dieser Experimente wird

zudem deutlich, dass NCAM-Polysialylierung immer von Autopolysialylierung begleitet wird. Dieses Ergebnis steht in direktem Widerspruch zu der von der Arbeitsgruppe um K. Colley aufgestellten These, dass Autopolysialylierung keine Voraussetzung für NCAM-Polysialylierung ist [147].

Die Mutante PST/M333V, auf die unter IV 2.12 näher eingegangen wird, hat ein nahezu identisches Aktivitätsprofil wie die hier beschriebene Mutante PST/R277G. Da jedoch die mutierten Positionen in der Primärsequenz relativ weit (56 AS) voneinander entfernt liegen, könnten hier unterscheidliche Oligomerisierungsdomänen betroffen sein, sodaß sich der Defekt beider Mutanten gegenseitig wieder aufheben würde. Ko-Transfektionsexperimente und entsprechende *in vitro*-Aktivitätstests zeigten jedoch, dass beide Mutanten nicht in der Lage sind, sich *in vitro* gegenseitig zu polysialylieren oder in transfizierten 2A10-Zellen zur kompletten Wiederherstellung der PSA-Expression zu führen (siehe III 2.5.4). Hier ist somit entweder die gleiche Wechselwirkungs-Domäne betroffen, oder es werden Bereiche im aktiven Zentrum, welche direkt an der Katalyse der Autopolysialylierung beteiligt sind, durch die Mutationen unabhängig voneinander beeinflusst.

IV 2.9 Glycin²⁸¹ (PST) / Glycin²⁹⁶ (STX)

Glycin²⁸¹ ist Bestandteil des S-Sialylmotives und ausnahmslos in allen bis jetzt bekannten Sialyltransferasen an entsprechender Position vorhanden. Im 2A10-Klon 5C3 liegt ein Austausch dieser Aminosäure gegen Serin vor. Die davon abgeleiteten Mutanten PST/G281S und STX/G296S zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine katalytische Aktivität (Abb. 21, Seite 64; Abb. 23, Seite 66). Das intrazelluläre Targeting sowie die Synthese und Sekretion der Mutanten wurde nicht beeinträchtigt (siehe III 2.4). Frühere Studien, die sich mit der kinetischen Charakterisierung von ST6Gall-Varianten beschäftigten, wiesen der entsprechenden Mutante (ST6Gall/G321A) lediglich dreifach erhöhte K_M -Werte für das Donor- und Akzeptorsubstrat zu [79]. Diese Diskrepanz kann durch die unterschiedlichen für Glycin substituierten Aminosäuren bedingt sein, da die chemischen Eigenschaften des Alanins (ST6Gall) eher als die des Serins (PST/STX) mit der natürlich vorkommenden Aminosäure zu vergleichen sind. Da die Aktivitätstests in der vorliegenden Arbeit jedoch keine quantitative Auswertung erlauben, ist ein direkter Vergleich mit denen von Datta *et al.* (1998) nicht möglich [79]. Zudem muss man beachten, dass die Signale der Polysialyltransferasen im Vergleich zu denen der Monosialyltransferasen um ein Vielfaches intensiver ausfallen.

IV 2.10 Methionin²⁸⁴ (PST) / Methionin²⁹⁹ (STX)

Das im S-Sialylmotiv gelegene Methionin²⁸⁴ ist mit Ausnahme der ST6GalNAcI nur in Enzymen, die Polysialylierungsreaktionen katalysieren (ST8SiaII, ST8SiaIII und ST8SiaIV), konserviert. Monosialyltransferasen mit α 2,8-Spezifität weisen an entsprechender Position ein Leucin auf. Insgesamt findet man an dieser Position nur Aminosäuren mit kleinen aliphatischen oder kleinen polaren Seitenketten (siehe VI 2). Die Mutation Methionin²⁸⁴ → Isoleucin wurde in der RT-PCR-Analyse des 2A10-Klons 2B12 entdeckt. Nach der Sequenzierung weiterer 2B12-cDNAs stellte sich aber heraus, dass für den Funktionsverlust der PST in diesem Klon eine frühzeitige Stop-Mutation verantwortlich ist (siehe III 2.6). Die dennoch durchgeführte Analyse der Mutanten PST/M284I und STX/M299I ergab ein Aktivitätsprofil, das den Arginin^{277/292}- und Methionin^{333/348}-Mutanten (siehe IV 2.8 und IV 2.12) sehr ähnelte. Die löslichen Proteine wurden ebenfalls auf Wildtypniveau exprimiert, zeigten *in vitro* nur minimale Autopolysialylierung und waren trotzdem in der Lage, NCAM zu polysialylieren (Abb. 31A/B, Seite 78). Die Beeinträchtigungen der STX-Mutante waren dabei stärker ausgeprägt als die der PST-Mutante, was besonders bei der Polysialylierung in Gegenwart von NCAM deutlich wurde. *In vivo* zeigte PST/M284I bzw. STX/M299I im Gegensatz zu den Arginin^{277/292}- und Methionin^{333/348}-Mutanten eine im Vergleich mit dem Wildtyp äquivalente bzw. nur geringfügig verminderte Aktivität bei der NCAM-Polysialylierung (Abb. 31E). Alle drei betroffenen Aminosäuren sind somit hauptsächlich an der Katalyse der Autopolysialylierung beteiligt, wobei die dadurch bedingten Auswirkungen auf die NCAM-Polysialylierung *in vivo* unterschiedlich stark ausfielen. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Struktur der Enzyme ist in allen Fällen nur gering, kann sich aber in dem Fall, dass das aktive Zentrum betroffen ist, erheblich auf die Aktivität auswirken. Zudem wurden diese Strukturveränderungen durch die Gegenwart von NCAM partiell wieder rückgängig gemacht.

IV 2.11 Cystein²⁹² (PST)

Dieses Cystein ist Bestandteil des S-Sialylmotives und wie Cystein¹⁴² in der gesamten Gruppe der Sialyltransferasen konserviert. Cystein²⁹² soll der Gegenspieler des Cystein¹⁴² in der schon vielfach postulierten intramolekularen Disulfidbrücke sein [79,175]. Der Austausch von Cystein²⁹² zu Alanin resultierte in einem massiv destabilisierten Protein, das sich weder intrazellulär noch im Überstand von transfizierten 2A10- oder COS-Zellen darstellen ließ (Abb. 35, Seite 82). Die Ergebnisse für die Mutanten PST/C292A und PST/C142A stimmen somit

exakt überein (siehe dazu IV 2.3) und liefern ein weiteres Indiz für die Ausbildung einer Disulfidbrücke. Die entsprechende Mutante der α 2,6-Sialyltransferase (ST6GalI/C332A) konnte im Gegensatz zur PST-Mutante sogar 2 bis 5mal besser als der Wildtyp in COS-Zellen exprimiert werden, zeigte aber unter 5% der Aktivität des Wildtyps [79]. Die Einflüsse dieses Cysteins auf die Struktur sind somit bei der PST weitaus größer als bei der ST6GalI.

IV 2.12 Methionin³³³ (PST) / Methionin³⁴⁸ (STX)

Methionin³³³ bildet eine Ausnahme unter den 2A10-Mutationen, da diese Aminosäure nicht in der gesamten Gruppe α 2,8-Sialyltransferasen konserviert ist. In der ST8SiaIII befindet sich an dieser Position ein Leucin. Sialyltransferasen anderer Spezifität besitzen ebenfalls eine Vorliebe für kleine aliphatische Aminosäuren (Alanin, Valin, Leucin) an dieser Position. Die einzige Ausnahme bilden die Enzyme der Gruppe ST6GalNAc, die nach dem korrigierten Sequenzvergleich Phenylalanin an dieser Position aufweisen (siehe dazu VI 2). Methionin³³³ liegt zwischen den beiden hochkonservierten Aminosäuren des VS-Sialylmotives, Histidin³³¹ und Glutamin³³⁶ [77], von denen letztere auch durch eine 2A10-Mutation betroffen ist (siehe IV 2.13). Im 2A10-Klon 2D8 ist Methionin³³³ gegen Valin ersetzt, eine Aminosäure, die z.B. an entsprechender Position in der ST3GalIII vorhanden ist. Zusätzlich ist im Klon 2D8 eine weitere Aminosäure ausgetauscht (Cystein³⁵⁶→Phenylalanin, siehe IV 2.14). Das Aktivitätsprofil von PST/M333V entspricht größtenteils dem von PST/R277G (siehe IV 2.8). Beide Mutanten zeigten *in vitro* eine drastische Reduktion der Autopolysialylierung, waren aber in Gegenwart von NCAM wieder in der Lage, sich selbst und NCAM zu polysialylieren (Abb. 20, Seite 63). Die Aktivität der PST wurde jedoch durch die Mutation M333V stärker beeinträchtigt. Dieser Unterschied wirkte sich auch *in vivo* aus. Hier konnte im Gegensatz zu PST/R277G nach Transfektion von PST/M333V weder in COS- noch in 2A10-Zellen Polysialinsäure an NCAM oder am Enzym selbst nachgewiesen werden (Abb. 17, Seite 60; Abb. 27/Abb. 28, Seite 73/72). Die Ergebnisse der entsprechenden STX-Mutanten STX/R292G und STX/M348V fielen dagegen *in vivo* und *in vitro* identisch aus (Abb. 18, Seite 60; Abb. 22, Seite 66).

Da PST/M333V in der Zelle keine Restaktivität zeigte, konnten mit dieser Mutante Experimente zur Oligomerisierung durchgeführt werden. Zum einen wurde durch Transfektion von PST/M333V in CHO-K1-Zellen versucht, den Wildtyp aus einem potentiellen Komplex zu verdrängen, und somit die PSA-Synthese zu inhibieren (III 2.5.5). Es wurde jedoch kein Effekt beobachtet, was auch durch die lange Halbwertszeit der PSA, die die Dauer eines Transfektionsexperimentes unter Umständen überdauert, erklärt werden kann.

Daher wurde im nächsten Experiment der Wildtyp zusammen mit einem Überschuß der Mutante (bis 1 : 100) in 2A10-Zellen transfiziert. Aber auch bei konstanter Transfektionseffizienz konnte keine Abschwächung des PSA-Signals durch PST/M333V beobachtet werden. Der parallele Versuch mit der komplett inaktiven PST/T189I führte zum gleichen Ergebnis. Mögliche Erklärungen sind:

- 1) Die Konzentration der Mutanten reichte nicht aus, um den Wildtyp effektiv zu verdrängen.
- 2) PST liegt in der Zelle nicht als Dimer oder Oligomer vor.
- 3) Die Mutanten PST/T189I und PST/M333V haben die Fähigkeit zur Bildung von Komplexen verloren.

Die Ursache für den selektiven Verlust der Autopolysialylierung konnte somit noch nicht eindeutig identifiziert werden. Durch die Mutation wurde entweder die Fähigkeit zur Multimerisierung beeinträchtigt oder die sterische Anordnung der an der Katalyse beteiligten Elemente geringfügig verändert. Möglich ist auch, dass die ausgetauschten Aminosäuren selbst in den Katalysemechanismus eingreifen.

Zur Untersuchung, welche chemischen Komponenten an der Position 333 für die Aktivität der PST benötigt werden, wurde eine zusätzliche Variante hergestellt und analysiert. In Analogie zur ST8SiaIII, die sich ebenfalls autopolysialyliert, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als PST [148], wurde an dieser Position ein Leucin eingefügt. Die Mutante PST/M333L verhielt sich den Erwartungen gemäß in allen Experimenten wie der Wildtyp (III 2.5.6). Die zusätzliche CH₂-Gruppe, die Leucin von Valin unterscheidet, entscheidet somit über die katalytische Aktivität der PST. Man kann also davon ausgehen, dass hier die sterischen Effekte, die durch die Verkürzung der Aminosäureseitenkette ausgelöst wurden, und nicht die chemischen Eigenschaften an dieser Position ausschlaggebend für den Aktivitätsverlust sind. Eine direkte Beteiligung von Methionin³³³ am Katalyseprozeß kann somit ausgeschlossen werden.

IV 2.13 Glutaminsäure³³⁶ (PST) / Glutaminsäure³⁵¹ (STX)

Diese Aminosäure bildet zusammen mit Histidin³³¹ (PST) bzw. Histidin³⁴⁶ (STX) das VS-Sialylmotiv [77]. Sie ist, wie Tab. 11 auf Seite 127 verdeutlicht, in allen α 2,3- und α 2,8-Sialyltransferasen vorhanden. Bei den α 2,6-Sialyltransferasen (ST6Gal und ST6GalNAc) ist der Homologievergleich in diesem Bereich schwieriger, da beide Gruppen N-terminal vom VS-Sialylmotiv entsprechend dem in Abb. 15 dargestellten Sequenzvergleich einen Einschub von ca. 20 Aminosäuren aufweisen. In dieser zusätzlichen Sequenz befindet sich ein Bereich,

der zum VS-Sialylmotiv homolog ist. Man kann also davon ausgehen, dass Glutaminsäure³³⁶ in allen Sialyltransferasen konserviert ist (siehe dazu auch VI 2). Anstelle dieser Aminosäure ist in der PST des 2A10-Klons 9C8 ein Lysin zu finden. Die Mutanten PST/E336K und STX/E351K haben ihre katalytische Aktivität komplett verloren (Abb. 21, Seite 64; Abb. 23, Seite 66). Für beide konnte jedoch die korrekte intrazelluläre Lokalisation (siehe III 2.4) und Expression nachgewiesen werden. Der Austausch der Glutaminsäure gegen Lysin, eine positiv geladene Aminosäure mit entgegengesetzten chemischen Eigenschaften, wirkt sich somit fatal auf die Aktivität aber kaum auf die Struktur, Stabilität und das Targeting der Polysialyltransferasen aus. Diese Ergebnisse unterstützen die von Geremia *et al.* (1997) anhand von Sequenzhomologien aufgestellte Vermutung, dass das VS-Sialylmotiv und speziell die Glutaminsäure direkt in den Katalysemechanismus bei der Übertragung von Sialinsäuren auf das nicht-reduzierende Ende von Polysaccharidketten eingreift [77].

IV 2.14 Cystein³⁵⁶ (PST) / Cystein³⁷¹ (STX)

Insgesamt ist die Homologie innerhalb der Sialyltransferasen C-terminal vom VS-Sialylmotiv nicht sehr ausgeprägt. Auch dieses Cystein ist nur in den α 2,8-Sialyltransferasen und in der ST6GalI vorhanden. In der PST des 2A10-Klons 2D8 liegt zusätzlich zur Mutation Cystein³⁵⁶ \rightarrow Phenylalanin eine weitere Mutation vor (M333V, siehe IV 2.12). Die Sekretion der Mutante PST/C356F war gegenüber dem Wildtyp deutlich verringert, wenngleich intrazellulär äquivalente Mengen nachzuweisen waren (Abb. 20, Seite 63). Die *in vitro* ausgebliebene PSA-Synthese kann somit auch durch die geringere Enzymkonzentration auf der Gelmatrix bedingt worden sein (Abb. 20, Seite 63). Die Tatsache, dass auch die transfizierten Zellen keine PSA exprimierten, beweist jedoch, dass PST/C356F keine katalytische Aktivität besitzt. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass STX besser synthetisiert und sekretiert wird als PST, zeigte STX/C371F, die in allen Tests ebenfalls inaktiv war, ein normales Sekretionsverhalten (Abb. 23, Seite 66). Die Analyse der intrazellulären Lokalisation ergab, dass PST/C356F nicht wie der Wildtyp nur im Golgi-Apparat, sondern vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert war (Abb. 24, Seite 68). Doppelfärbungen mit ER-Marker bestätigten diesen Befund (Abb. 25, Seite 69). Für STX war eine eindeutige Aussage aufgrund der schon für den Wildtyp diffusen Signale nicht möglich (siehe auch III 2.4, IV 2.1). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass der C-Terminus der Polysialyltransferasen sowohl für die Stabilität und Aktivität als auch für das intrazelluläre Targeting verantwortlich ist. Um einen Vergleich mit den anderen Cysteinmutanten zu ermöglichen und um zu testen, ob eine gleichgroße und polare Aminosäure, die ebenfalls als

Elektronendonoren fungieren kann, die Funktion des Cysteins übernehmen kann, wurden die Mutanten PST/C356A und PST/C356S hergestellt und analysiert. Aber weder Alanin noch Serin konnte die Funktion des Cysteins an Position 356 übernehmen (siehe III 4.2).

Die Tatsache, dass sich PST/C356A im Gegensatz zu den anderen vier Cysteinmutanten wenigstens intrazellulär noch darstellen ließ, ist ein Indiz dafür, dass Cystein³⁵⁶ nicht an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt ist. Wäre Cystein³⁵⁶ jedoch ausschließlich an der Katalyse beteiligt, dann würde eine Mutante keine derartig drastischen Beeinträchtigungen der Proteinstabilität und des Targetings aufweisen. Zudem hätte der Austausch durch Serin die Defekte nahezu kompensieren müssen. Die Thiol-Funktion des Cystein³⁵⁶ ist daher essentiell an der Faltung, am Targeting und somit auch an der Katalyse der Polysialyltransferasen beteiligt.

IV 2.15 Methionin³⁵⁷ - Glutamin³⁵⁹ (PST)

Die α 2,8-Sialyltransferasen weisen C-terminal von Cystein³⁵⁶ (PST) keine Homologie auf. Die Enzyme der Subklasse III besitzen den kürzesten Terminus, der aus einem Alanin besteht. Alle PST-Verkürzungen (PST/K358stop, PST/M357Astop, PST/C356stop) besaßen volle katalytische Aktivität (siehe III 3). Die Sequenz C-terminal von Cystein³⁵⁶ ist somit für die Aktivität und Stabilität der PST nicht notwendig.

IV 3 Zusammenfassung der Struktur-Funktionsanalyse

In Tab. 10 sind die Erkenntnisse aus der Analyse der PST- und STX-Mutanten unter Berücksichtigung der Homologie zu anderen Sialyltransferasen noch einmal zusammengefasst.

Aminosäure(n)		Homologie	Bedeutung für die Struktur und Funktion des Enzyms
PST	STX		
Methionin ¹ - Lysin ⁵⁸	Methionin ¹ - Asparaginsäure ⁶⁹	schwach	keine
Cystein ¹⁴²	/	alle STs	essentiell für die Strukturausbildung und Stabilität der PST
Glycin ¹⁴⁶	Glycin ¹⁶¹	alle α 2,3- / α 2,8-STs	maßgeblich an der Katalyse beteiligt (Bindung des Donorsubstrates)
Cystein ¹⁵⁶	/	alle α 2,8-STs	essentiell für die Strukturausbildung und Stabilität der PST
Cystein ¹⁶⁹	/	alle α 2,8-STs	essentiell für die Strukturausbildung und Stabilität der PST
Threonin ¹⁸⁹	Threonin ²⁰⁴	alle α 2,8-STs	maßgeblich an der Katalyse von α 2,8-glykosidischen Bindungen beteiligt
Valin ²³⁰	/	keine	keine
Arginin ²⁷⁷	Arginin ²⁹²	alle α 2,8-STs	essentiell für die Autopolysialylierung <i>in vitro</i> , vermindert die Polysialylierung <i>in vivo</i> , beeinflusst insg. die Feinstruktur im aktiven Zentrum
Glycin ²⁸¹	Glycin ²⁹⁶	alle STs	maßgeblich an der Katalyse beteiligt (Bindung des Donor- und Akzeptorsubstrates)
Methionin ²⁸⁴	Methionin ²⁹⁹	ST8SiaII/III/IV	essentiell für die Autopolysialylierung <i>in vitro</i> , vermindert kaum die Polysialylierung <i>in vivo</i> , beeinflusst insg. die Feinstruktur im aktiven Zentrum
Cystein ²⁹²	/	alle STs	essentiell für die Strukturausbildung und Stabilität der PST
Methionin ³³³	Methionin ³⁴⁸	ST8SiaI/II/IV/V	essentiell für die Autopolysialylierung <i>in vitro</i> und die Polysialylierung <i>in vivo</i> , beeinflusst insg. die Feinstruktur im aktiven Zentrum
Glutaminsäure ³³⁶	Glutaminsäure ³⁵¹	alle STs	maßgeblich an der Katalyse beteiligt
Cystein ³⁵⁶	Cystein ³⁷¹	alle α 2,8-STs	essentiell für das Targeting und die Aktivität <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> , wichtig für die Struktur und Stabilität
Methionin ³⁵⁷ - Glutamin ³⁵⁹	/	keine	keine

Tab. 10: Tabellarische Zusammenfassung der Struktur-Funktionsanalyse der Polysialyltransferasen. ST(s) steht für Sialyltransferase(n).

IV 3.1 Überlegungen zum Reaktionsmechanismus

Aus der Analyse der PST- und STX-Mutanten lassen sich einige Aussagen über den Reaktionsmechanismus der Polysialyltransferasen ableiten. Beide Enzyme zeigen keine Unterschiede bezüglich der aktivitäts- und strukturbestimmenden Elemente, wengleich äquivalente Mutationen bei der STX stärkere Effekte auslösen. Die hochkonservierten Aminosäuren in den Sialylmotiven (Glycin^{146/161}, Glycin^{281/296}, Glutaminsäure^{336/351}) sind auch bei den Polysialyltransferasen für die grundlegenden katalytischen Fähigkeiten, wie z.B. Donor- und Akzeptorsubstratbindung, verantwortlich. Unter den Aminosäuren, die nur innerhalb der α 2,8-Sialyltransferasen konserviert sind, ist nur Threonin^{189/204} essentiell für jegliche Aktivität der PST bzw. STX. Die übrigen Positionen (Arginin^{277/292}, Methionin^{284/296}, Methionin^{333/348}) wirken sich selektiv auf die Fähigkeit der Enzyme, sich *in vitro* zu autopolysialylieren, aus und betreffen unterschiedlich stark auch die Polysialylierung *in vivo*. Dabei vermag der enge Kontakt zum Akzeptor NCAM *in vitro* in allen diesen Mutanten, *in vivo* dagegen komplett nur bei PST/M284I und partiell bei PST/R277G und STX/M299I die Beeinträchtigungen durch diese Mutationen wieder aufzuheben. Die Wiederherstellung der NCAM-Polysialylierung ging dabei immer einher mit der Wiederherstellung der Autopolysialylierung. Es kann sich also bei diesen Positionen nicht um katalytisch aktive Aminosäuren handeln, da die Mutanten unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, alle katalytischen Fähigkeiten auszuüben. Vielmehr müssen hier durch die Mutationen reversible Veränderungen im aktiven Zentrum, wie z.B. geringfügige Dislokationen von katalytisch aktiven Aminosäuren oder an der Katalyse beteiligten Kohlenhydraten, ausgelöst worden sein. Die Beteiligung von Zuckern an der Ausbildung von katalytisch aktiven Polysialyltransferasen haben frühere Studien schon eindeutig bewiesen [145,174]. Es wurde gezeigt, dass Polysialyltransferasen mit terminal galaktosylierten N-Glykanen, wie sie von Lec2-Zellen exprimiert werden, im Gegensatz zu Enzymen ohne Galaktosen, die in Lec8-Zellen synthetisiert worden waren, katalytisch voll aktiv sind. Ob die Zucker der Polysialyltransferasen dabei aber direkt in die Katalyse eingreifen, oder ob sie nur den Akzeptor für die autokatalytisch synthetisierten PSA-Ketten bilden, wurde nicht geklärt. Bei den Mutanten, die sich nicht mehr autopolysialylieren können, werden diese Zucker dann erst durch die Interaktion mit NCAM an eine für die Synthese der enzymgebundenen PSA zugängliche Position gebracht. Die so reaktivierten Mutanten sind dann auch wieder in der Lage, NCAM zu polysialylieren. Frühere Studien haben eindeutig gezeigt, dass bei dieser Reaktion jedoch keine präformierte PSA-Ketten übertragen werden [145]. Da diese Aminosäuren in der

Primärsequenz relativ weit voneinander entfernt liegen und durch deren Mutation nahezu gleiche Effekte ausgelöst werden, kann man davon ausgehen, dass die Bereiche in der Nähe des S- und VS-Sialylmotives an der Ausbildung des höchst sensiblen, für die Polysialylierungsreaktion spezifischen aktiven Zentrums beteiligt sind.

Ob die Autopolysialylierung nun eine inter- oder intramolekulare Reaktion ist, konnte hier nicht eindeutig geklärt werden. Die Studien zur Oligomerisierung (siehe dazu IV 2.8 und IV 2.12) haben ausgeschlossen, dass Wildtyp-PST mit den Mutanten PST/T189I bzw. PST/M333V einen stabilen Komplex eingeht und dass eine Wechselwirkung zwischen den Mutanten PST/R277G und PST/M333V zur Wiederherstellung der Autopolysialylierungsaktivität führt. Bei einer intermolekularen Reaktion müsste zudem die Gegenwart von NCAM bei den Mutanten, die einen Defekt in der Autopolysialylierung aufweisen, die Ausbildung des katalytisch aktiven Multimers induzieren.

Neben den Polysialyltransferasen wurden bis jetzt zwei weitere Enzyme beschrieben, die sich in einer Polymerisationsreaktion automodifizieren. Dazu zählt zum einen das Glykogenin, das für die Initialisierung der Glykogensynthese verantwortlich ist, und zum anderen die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die u.a. an der DNA-Reparatur beteiligt ist.

Glykogenin, ein Protein mit 37 kDa, das in einem Komplex mit der Glykogensynthase vorliegt, bildet an der Hydroxylgruppe eines hochkonservierten Tyrosinrestes in einer autokatalytischen Reaktion ein Polymer aus acht bis 20 α 1,4-verknüpften Glukosemolekülen, das dann als Akzeptor für die Glykogensynthase dient (zur Übersicht siehe [183], Details in [184]). In Übereinstimmung mit der Polysialylierung ist diese Reaktion Mn^{2+} -abhängig und benötigt den aktivierten Zucker, hier UDP-Glukose als Donorsubstrat. Für die Mn^{2+} -Bindung wurde ein Motiv aus drei Aminosäuren (Asparaginsäure-Alanin-Asparaginsäure) identifiziert, das auch in anderen Glykosyltransferasen nachgewiesen wurde [185,186]. Für die Sialyltransferasen existiert als mögliches Äquivalent im L-Sialylmotiv eine sehr ähnliche hochkonservierte Sequenz aus den Aminosäuren Asparaginsäure-Valin-Glutaminsäure. Die gezielte Mutagenese eines hochkonservierten Lysinrestes im Glykogenin aus Kaninchenmuskel (Lysin⁸⁵→Glutamin), führte zu einer katalytisch inaktiven Mutante, die aber von einer anderen Mutante, die anstelle des katalytisch essentiellen Tyrosin¹⁹⁴ ein Phenylalanin aufweist und alleine auch inaktiv war [187,188], autoglykosyliert werden konnte [189]. Damit ist für das Glykogenin der Beweis erbracht, dass es sich bei der Autoglykosylierung um einen intermolekularen Mechanismus handelt. Desweiteren konnte ein Dimer aus Glykogeninmolekülen in Gelfiltrationsexperimenten [190] und in der Kristallographie [191]

nachgewiesen werden. Ob es zur Bildung von Tetrameren oder größeren Komplexen kommt, konnte noch nicht gezeigt werden. Für die Polysialyltransferasen konnte die Existenz eines entsprechenden Mutantenpaares und damit die Oligomerisierung entweder aufgrund der zufällig bedingten Mutationen in der Komplementationsgruppe 2A10 in dieser Arbeit noch nicht nachgewiesen werden oder sie ist wegen eines abweichenden Reaktionsmechanismus ganz auszuschließen. Für Glykogenin konnte auch gezeigt werden, dass die Autoglykosylierung, die Hydrolyse von UDP-Glukose und die Glykosylierung von anderen Akzeptoren in einem aktiven Zentrum stattfindet [192]. Eine weitere Parallele zu den Polysialyltransferasen besteht darin, dass auch zwei homologe Formen des Glykogenins (Glykogenin-1 und -2) existieren, die gewebsspezifisch exprimiert werden und sich in ihren katalytischen Fähigkeiten nur geringfügig unterscheiden [193]. Glykogenin-1 ist das aktivere Enzym, das zusätzlich in der Lage ist, die Autoglykosylierung von Glykogenin-2 zu verstärken [194]. Ko-Immunpräzipitationsexperimente in dieser Studie haben zudem gezeigt, dass beide Enzyme, die jeweils ein minimales Leucin-Zipper-Motiv enthalten, einen stabilen Komplex eingehen. Diese Daten implizieren, dass Glykogenin-1 entweder der allosterische Aktivator von Glykogenin-2 ist oder in einem oligomeren Komplex Glykogenin-2 glykosyliert. Ob PST und STX sich gegenseitig in ähnlicher Weise beeinflussen, wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym, das durch die Bindung an Einzelstrangbrüche in der DNA die Polymerisation von bis zu 200 ADP-Ribosemolekülen aus NAD^+ an mehreren DNA-bindenden Proteinen und sich selbst katalysiert (zur Übersicht siehe [195]). PARP besteht aus 1014 Aminosäuren und ist in drei Domänen gegliedert: die DNA-bindende Domäne am N-Terminus, die katalytische Domäne am C-Terminus und die zentrale Automodifikationsdomäne, die 15 hochkonservierte, automodifizierbare Glutaminsäuren enthält und für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Die Initiationsreaktion der Poly-ADP-Ribosylierung besteht aus dem Transfer einer ADP-Ribose aus NAD^+ auf eine Glutaminsäure des Akzeptorproteins. Zur Elongation werden dann ADP-Ribose-Einheiten über (1'-2'')-glykosidische Bindungen verknüpft. Die Verzweigung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten in einer (2''-1''')-Bindung, die einmal in 40 ADP-Ribose-Einheiten auftritt, wird ebenfalls von der PARP katalysiert. Die autokatalytische Poly-ADP-Ribosylierung findet nach der Ausbildung eines Homodimers in einer intermolekularen Reaktion statt [196]. Die automodifizierte PARP greift dann z.B. in die Aktivierung des 20S-Proteasoms [197] oder die Rekrutierung von Signalproteinen, wie p53 oder MARCKS, die beide ein Bindungsmotiv für das ADP-Ribose-Polymer aufweisen [198], ein. In Übereinstimmung mit den Polysialyltransferasen konnte auch für die PARP gezeigt werden, dass die enzymgebundenen Polymere

keine Zwischenprodukte bei der Poly-ADP-Ribosylierung anderer Akzeptoren darstellen [195]. Ansonsten weisen beide Enzymklassen keine Gemeinsamkeiten auf, was allein schon durch die unterschiedlichen Substrate erklärt werden kann.

IV 3.2 Überlegungen zur Disulfidbrückenstruktur

Eindeutige Beweise zur Disulfidbrückenstruktur, die aus der Analyse des PST-MycHis-Fusionsproteins anhand von Proteaseverdaus und anschließender Analyse der Spaltstücke durch Massenspektroskopie zu erwarten gewesen wären, liegen zur Zeit leider noch nicht vor. Die jetzt aktuelle Hypothese basiert auf der Analyse der Cysteinmutanten und der Alkylierung des PST-MycHis-Fusionsproteins. Die ersten beiden der insgesamt sieben Cysteine in der PST haben keinen Einfluß auf die Aktivität des Proteins (siehe IV 2.2). Der Austausch eines der restlichen fünf Cysteine (siehe dazu Abb. 44, Seite 96) gegen Alanin bewirkte dagegen einen erheblichen Stabilitätsverlust des mutierten Enzyms, sodass alle Mutanten rekombinant nicht darzustellen waren. Im Fall des Cysteins am C-Terminus war die Beeinträchtigung durch die Mutation nicht so erheblich, da die Mutanten PST/C356A und PST/C356F wenigstens intrazellulär noch nachzuweisen war. Die Mutante STX/C371F zeigte dagegen ein dem Wildtyp äquivalentes Expressionsverhalten. In beiden Fällen bedingte aber der Austausch dieses Cysteins den Verlust der katalytischen Aktivität. Da sich somit das C-terminal gelegene Cystein in seiner Bedeutung für die Stabilität der PST von den übrigen vier Cysteinen abhebt, ist anzunehmen, dass Cystein^{356/371} als freie Thiol-Gruppe reduziert vorliegt. Da die Einzelmutanten der übrigen Cysteine identische Defizite aufweisen, und aufgrund der Ergebnisse der Alkylierungsversuche (siehe III 6.2) wird hier die Existenz von zwei Disulfidbrücken in der PST postuliert. Unter Berücksichtigung der unterschiedlich starken Konservierung ist weiterhin anzunehmen, dass an einer Disulfidbrücke die hochkonservierten Cysteine der Positionen 142 und 292 (siehe dazu IV 2.3, IV 2.11) und an der anderen Cystein¹⁵⁶ und Cystein¹⁶⁹, welche nur innerhalb der α 2,8-Sialyltransferasen konserviert sind (siehe dazu IV 2.5), beteiligt sind.

IV 4 Ausblick

Um eine eindeutige Korrelation zwischen essentiellen Aminosäuren und deren Beteiligung am Katalysemechanismus der Polysialyltransferasen treffen zu können, sind eingehendere Charakterisierungen der vorhandenen Mutanten und zusätzliche Mutagenesestudien notwendig. Um die exakten chemischen Anforderungen an die in dieser Arbeit identifizierten essentiellen Positionen kennenzulernen, bietet sich der gezielte Austausch gegen andere Aminosäuren an diesen Positionen an. Zudem gibt es noch weitere interessante Aminosäuren z.B. in den Sialylmotiven der Polysialyltransferasen, deren Mutation aufschlussreich wäre.

Zur Klärung der Frage, ob die Autopolysialylierung eine mono- oder bimolekulare Reaktion ist, die auf Oligomerisierung beruht, sind sicherlich zunächst Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit verschiedenen Fusionsproteinen von Wildtyp-PST bzw. -STX und mit der Kombination beider Polysialyltransferasen durchzuführen. Interessant wäre dann, ob die 2A10-Mutanten, insbesondere die in der Autopolysialylierung negativen Mutanten sich in analogen Experimenten vom Wildtyp unterscheiden. Zur eindeutigen Beantwortung der Frage, ob und wie Kohlenhydrate in den Katalysemechanismus eingreifen, bieten die erst seit kurzem zugänglichen N-Glykosylierungsmutanten der PST und STX zusammen mit den in der Autopolysialylierung negativen Mutanten und entsprechenden Doppelmantanten eine geeignete Basis für kombinierte *in vitro*-Aktivitätstests.

Eindeutige Aussagen über die Disulfidbrückenstruktur der PST werden durch die weitere Analyse des PST-MycHis-Fusionsproteins durch Proteaseverdau und anschließende hochsensitive Analytik mit dem Massenspektrometer möglich. Eine Alternative bestünde im Austesten verschiedener Expressionssysteme mit der Option, die Cysteinmutanten auf andere Weise dennoch rekombinant darstellen zu können.

Da sehr viele Klone innerhalb der Komplementationsgruppe 2A10 einen Defekt aufweisen, der entweder die Transkriptionseffizienz oder die mRNA-Stabilität betrifft, eignen sich diese Klone, um Studien bezüglich der genomischen Organisation und Regulation des PST-Gens durchzuführen.

V LITERATURVERZEICHNIS

1. **Schauer, R., Schoop, H. J., and Faillard, H.** (1968) On biosynthesis of the glycolyl groups of N-glycolylneuraminic acid. Oxidative conversion of N-acetyl groups to glycolyl groups. *Hoppe Seylers.Z.Physiol.Chem.* 349, 645-652
2. **Lepers, A., Shaw, L., Schneckenburger, P., Cacan, R., Verbert, A., and Schauer, R.** (1990) A study on the regulation of N-glycolylneuraminic acid biosynthesis and utilization in rat and mouse liver. *Eur.J.Biochem.* 193, 715-723
3. **Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y.** (1986) A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D- galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J.Biol.Chem.* 261 , 11550-11557
4. **Kanamori, A., Inoue, S., Iwasaki, M., Kitajima, K., Kawai, G., Yokoyama, S., and Inoue, Y.** (1990) Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo(deaminated neuraminic acid) structure in O-linked glycan chains. *J.Biol.Chem.* 265, 21811-21819
5. **Higa, H. H. and Varki, A.** (1988) Acetyl-coenzyme A:polysialic acid O-acetyltransferase from K1-positive Escherichia coli. The enzyme responsible for the O-acetyl plus phenotype and for O-acetyl form variation. *J.Biol.Chem.* 263, 8872-8878
6. **Iwasaki, M., Inoue, S., and Troy, F. A.** (1990) A new sialic acid analogue, 9-O-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha -2,8-linked O-acetylated poly(N-glycolylneuraminyl) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs. *J.Biol.Chem.* 265, 2596-2602
7. **Manzi, A. E., Dell, A., Azadi, P., and Varki, A.** (1990) Studies of naturally occurring modifications of sialic acids by fast- atom bombardment-mass spectrometry. Analysis of positional isomers by periodate cleavage. *J.Biol.Chem.* 265, 8094-8107
8. **Kelm, S. and Schauer, R.** (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int.Rev.Cytol.* 175:137-240, 137-240
9. **Schauer, R. and Kamerling, J. P.** Chemistry, Biochemistry and Biology of Sialic Acids. Neuberger, A. and Deenen, L. L. M. (29B), 243-402. 1997. Amsterdam, Elsevier. Glycoproteins II. Montreuil, J., Vliegthart, F. G., and Schachter, H.
10. **Reuter, G. and Gabius, H. J.** (1996) Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 377, 325-342
11. **Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V., and Faye, L.** (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol.Biol.* 38, 31-48
12. **Bourbouze, R., Akiki, C. C.-B., I, and Percheron, F.** (2000) Mise en evidence de dérivés de l'acid neuraminique dans de glycoproteines végétales. *Carbohydr.Res.* 106, 21-30
13. **Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y.** (1992) Detection, isolation, and characterization of oligo/poly(sialic acid) and oligo/poly(deaminoneuraminic acid) units in glycoconjugates. *Anal.Biochem.* 202, 25-34
14. **Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., and Shaw, L.** (1995) Biochemistry and role of sialic acids. In Rosenberg, A., editor. *Biology of the sialic acids*, Plenum Press, New York
15. **Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W., and Nussenzweig, V.** (1991) A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65, 1117-1125
16. **Engstler, M., Reuter, G., and Schauer, R.** (1993) The developmentally regulated trans-sialidase from Trypanosoma brucei sialylates the procyclic acidic repetitive protein. *Mol.Biochem.Parasitol.* 61, 1-13

17. **Engstler, M., Schauer, R., and Brun, R.** (1995) Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop.* 59, 117-129
18. **Engstler, M. and Schauer, R.** (1993) Sialidases from African trypanosomes. *Parasitol.today* 9, 222-225
19. **Penner, J. L. and Aspinall, G. O.** (1997) Diversity of lipopolysaccharide structures in *Campylobacter jejuni*. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S135-S138
20. **Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., Nanni, M., Dall'Olio, F., Campadelli-Fiume, G., Tanner, J., and Kieff, E.** (1989) Characterization of N- and O-linked oligosaccharides of glycoprotein 350 from Epstein-Barr virus. *Virology* 170, 1-10
21. **Whittaker, G. R., Wheldon, L. A., Giles, L. E., Stocks, J. M., Halliburton, I. W., Killington, R. A., and Meredith, D. M.** (1990) Characterization of the high Mr glycoprotein (gp300) of equine herpesvirus type 1 as a novel glycoprotein with extensive O-linked carbohydrate. *J.Gen.Virol.* 71 (Pt 10), 2407-2416
22. **Mizuochi, T., Matthews, T. J., Kato, M., Hamako, J., Titani, K., Solomon, J., and Feizi, T.** (1990) Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N- acetylglucosamine residues. *J.Biol.Chem.* 265, 8519-8524
23. **Reuter, G. and Schauer, R.** (1994) Determination of sialic acids. *Methods Enzymol.* 230:168-99, 168-199
24. **Soares, R. M., de, A. S. R., Alviano, D. S., Angluster, J., Alviano, C. S., and Travassos, L. R.** (2000) Identification of sialic acids on the cell surface of candida albicans. *Biochim.Biophys.Acta* 1474, 262-268
25. **Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, W. J.** (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256, 673-675
26. **Narayanan, S.** (1994) Sialic acid as a tumor marker. *Ann.Clin.Lab.Sci.* 24, 376-384
27. **Shimamura, M., Shibuya, N., Ito, M., and Yamagata, T.** (1994) Repulsive contribution of surface sialic acid residues to cell adhesion to substratum. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 33, 871-878
28. **Olden, K., Parent, J. B., and White, S. L.** (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function. *Biochim.Biophys.Acta* 650, 209-232
29. **Schauer, R.** (1982) Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 40:131-234, 131-234
30. **Bhaskar, K. R., Garik, P., Turner, B. S., Bradley, J. D., Bansil, R., Stanley, H. E., and LaMont, J. T.** (1992) Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature* 360, 458-461
31. **Raju, T. S. and Davidson, E. A.** (1994) Role of sialic acid on the viscosity of canine tracheal mucin glycoprotein. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 205, 402-409
32. **Hirno, S., Kelm, S., Schauer, R., Nilsson, B., and Wadstrom, T.** (1996) Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to alpha-2,3-linked sialic acids. *Glycoconj.J.* 13, 1005-1011
33. **Miller-Podraza, H., Bergstrom, J., Teneberg, S., Milh, M. A., Longard, M., Olsson, B. M., Uggla, L., and Karlsson, K. A.** (1999) *Helicobacter pylori* and neutrophils: sialic acid-dependent binding to various isolated glycoconjugates. *Infect.Immun.* 67, 6309-6313
34. **Harford, J., Klausner, R. D., and Ashwell, G.** (1984) Inhibition of the endocytic pathway for asialoglycoprotein catabolism. *Biol.Cell* 51, 173-179
35. **Jancik, J. and Schauer, R.** (1974) Sialic acid--a determinant of the life-time of rabbit erythrocytes. *Hoppe Seylers.Z.Physiol.Chem.* 355, 395-400
36. **Schlepper-Schäfer, J., Kolb-Bachofen, V., and Kolb, H.** (1980) Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupffer cells. *Biochem.J.* 186, 827-831
37. **Bird, M. I., Foster, M. R., Priest, R., and Malhotra, R.** (1997) Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem.Soc.Trans.* 25, 1199-1206
38. **Kieda, C.** (1998) Role of lectin-glycoconjugate recognitions in cell-cell interactions leading to tissue invasion. *Adv.Exp.Med.Biol.* 435:75-82, 75-82
39. **Velupillai, P. and Harn, D. A.** (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 18-22

40. **Kelm, S., Schauer, R., and Crocker, P. R.** (1996) The Sialoadhesins--a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj.J.* 13, 913-926
41. **Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M., and Varki, A.** (1998) Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8, v
42. **Munday, J., Floyd, H., and Crocker, P. R.** (1999) Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J.Leukoc.Biol.* 66, 705-711
43. **Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M. T., Tang, S., de Bellard, M. E., Schnaar, R. L., Mahoney, J. A., Hartnell, A., and Bradfield, P.** (1994) Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr.Biol.* 4, 965-972
44. **Varki, A.** (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* 2, 25-40
45. **Brinkman-Van der Linden, E. C., Sjoberg, E. R., Juneja, L. R., Crocker, P. R., Varki, N., and Varki, A.** (2000) Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. *J.Biol.Chem.* 275, 8633-8640
46. **Karlsson, K. A.** (1995) Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 5, 622-635
47. **Herrler, G., Hausmann, J., and Klenk, D. C.** (1995) Sialic Acid as Receptor Determinant of Ortho- and Paramyxoviruses. In Rosenberg, A., editor. *Biology of the Sialic Acids*, Plenum Press, New York
48. **Schengrund, C. L., Dasgupta, B. R., and Ringler, N. J.** (1991) Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J.Neurochem.* 57, 1024-1032
49. **Schengrund, C. L. and Ringler, N. J.** (1989) Binding of Vibrio cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands. *J.Biol.Chem.* 264, 13233-13237
50. **Schengrund, C. L., Dasgupta, B. R., and Ringler, N. J.** (1993) Ganglioside GD3 enhances adherence of botulinum and tetanus neurotoxins to bovine brain synapsin I. *Neurosci.Lett.* 158, 159-162
51. **Reutter, W., Stasche, R., Stehling, P., and Baum, O.** (1997) The Biology of Sialic Acids: Insights into their Structure, Metabolism and Function in particular during Viral Infection. In Gabius, H. J. and Gabius, S., editors. *Glycosciences*, Chapman and Hall, Weinheim
52. **Vann, W. F., Tavarez, J. J., Crowley, J., Vimr, E., and Silver, R. P.** (1997) Purification and characterization of the Escherichia coli K1 neuB gene product N-acetylneuraminic acid synthetase. *Glycobiology.* 7, 697-701
53. **Merker, R. I. and Troy, F. A.** (1990) Biosynthesis of the polysialic acid capsule in Escherichia coli K1. Cold inactivation of sialic acid synthase regulates capsule expression below 20 degrees C. *Glycobiology* 1, 93-100
54. **Zapata, G., Vann, W. F., Aaronson, W., Lewis, M. S., and Moos, M.** (1989) Sequence of the cloned Escherichia coli K1 CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase gene. *J.Biol.Chem.* 264, 14769-14774
55. **Stoughton, D. M., Zapata, G., Picone, R., and Vann, W. F.** (1999) Identification of Arg-12 in the active site of Escherichia coli K1 CMP- sialic acid synthetase. *Biochem.J.* 343 Pt 2, 397-402
56. **Edwards, U. and Frosch, M.** (1992) Sequence and functional analysis of the cloned Neisseria meningitidis CMP-NeuNAc synthetase. *FEMS Microbiol.Lett.* 75, 161-166
57. **Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., and Venter, J. C.** (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* 388, 539-547
58. **Hinderlich, S., Stasche, R., Zeitler, R., and Reutter, W.** (1997) A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N- acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N- acetylmannosamine kinase. *J.Biol.Chem.* 272, 24313-24318

59. **Stasche, R., Hinderlich, S., Weise, C., Effertz, K., Lucka, L., Moormann, P., and Reutter, W.** (1997) A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N- acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J.Biol.Chem.* 272, 24319-24324
60. **Münster, A. K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P., and Gerardy-Schahn, R.** (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 9140-9145
61. **Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., and Gerardy-Schahn, R.** (1996) Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 7572-7576
62. **Taatjes, D. J., Roth, J., Weinstein, J., and Paulson, J. C.** (1988) Post-Golgi apparatus localization and regional expression of rat intestinal sialyltransferase detected by immunoelectron microscopy with polypeptide epitope-purified antibody. *J.Biol.Chem.* 263, 6302-6309
63. **Schauer, R.** (1991) Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glycobiology* 1, 449-452
64. **Shaw, L. and Schauer, R.** (1989) Detection of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in fractionated mouse liver. *Biochem.J.* 263, 355-363
65. **Schlenzka, W., Shaw, L., Schneckenburger, P., and Schauer, R.** (1994) Purification and characterization of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from pig submandibular glands. *Glycobiology.* 4, 675-683
66. **Gilbert, M., Watson, D. C., Cunningham, A. M., Jennings, M. P., Young, N. M., and Wakarchuk, W. W.** (1996) Cloning of the lipooligosaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J.Biol.Chem.* 271, 28271-28276
67. **Bozue, J. A., Tullius, M. V., Wang, J., Gibson, B. W., and Munson, R. S., Jr.** (1999) *Haemophilus ducreyi* produces a novel sialyltransferase. Identification of the sialyltransferase gene and construction of mutants deficient in the production of the sialic acid-containing glycoform of the lipooligosaccharide. *J.Biol.Chem.* 274, 4106-4114
68. **Melaugh, W., Campagnari, A. A., and Gibson, B. W.** (1996) The lipooligosaccharides of *Haemophilus ducreyi* are highly sialylated. *J.Bacteriol.* 178, 564-570
69. **Yamamoto, T., Nakashizuka, M., and Terada, I.** (1998) Cloning and expression of a marine bacterial beta-galactoside alpha2,6- sialyltransferase gene from *Photobacterium damsela* JT0160. *J.Biochem.(Tokyo)* 123, 94-100
70. **Jackson, R. J., Hall, D. F., and Kerr, P. J.** (1999) Myxoma virus encodes an alpha2,3-sialyltransferase that enhances virulence. *J.Virol.* 73, 2376-2384
71. **Sujino, K., Jackson, R. J., Chan, N. W., Tsuji, S., and Palcic, M. M.** (2000) A novel viral alpha2,3-sialyltransferase (v-ST3Gal I): transfer of sialic acid to fucosylated acceptors. *Glycobiology* 10, 313-320
72. **Tsuji, S.** (1996) Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J.Biochem.(Tokyo.)* 120, 1-13
73. **Paulson, J. C. and Colley, K. J.** (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type- specific glycosylation. *J.Biol.Chem.* 264, 17615-17618
74. **Gabius, H. J. and Gabius, S.,** editors (1997) *Glycosciences*, Chapman & Hall, Weinheim
75. **Livingston, B. D. and Paulson, J. C.** (1993) Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J.Biol.Chem.* 268, 11504-11507
76. **Kurosawa, N., Kojima, N., Inoue, M., Hamamoto, T., and Tsuji, S.** (1994) Cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc-specific GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase. *J.Biol.Chem.* 269, 19048-19053
77. **Geremia, R. A., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P.** (1997) Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology.* 7, v-vii
78. **Datta, A. K. and Paulson, J. C.** (1995) The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J.Biol.Chem.* 270, 1497-1500
79. **Datta, A. K., Sinha, A., and Paulson, J. C.** (1998) Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J.Biol.Chem.* 273, 9608-9614

80. **Sears, P. and Wong, C. H.** (1998) Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cell Mol.Life Sci.* 54, 223-252
81. **Colley, K. J.** (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* 7, 1-13
82. **Ma, J. and Colley, K. J.** (1996) A disulfide-bonded dimer of the Golgi beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose. *J.Biol.Chem.* 271, 7758-7766
83. **Colley, K. J., Lee, E. U., and Paulson, J. C.** (1992) The signal anchor and stem regions of the beta-galactoside alpha 2,6- sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the Golgi apparatus. *J.Biol.Chem.* 267, 7784-7793
84. **Dahdal, R. Y. and Colley, K. J.** (1993) Specific sequences in the signal anchor of the beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase are not essential for Golgi localization. Membrane flanking sequences may specify Golgi retention. *J.Biol.Chem.* 268, 26310-26319
85. **Troy, F. A.** (1995) Sialobiology and the Polysialic Acid Glycotope. In Rosenberg, A., editor. *Biology of the Sialic Acids*, Plenum Press, New York
86. **Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., and Gerardy-Schahn, R.** (1998) Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8, 558-564
87. **Baumann, H., Brisson, J. R., Michon, F., Pon, R., and Jennings, H. J.** (1993) Comparison of the conformation of the epitope of alpha(2-->8) polysialic acid with its reduced and N-acyl derivatives. *Biochemistry* 32, 4007-4013
88. **Jennings, H. J.** N-Propionylated Group B Meningococcal Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine against Group B Meningococcal Meningitis. *Int.J.Infect.Dis.* 1, 158-164. 1997.
89. **Toikka, J., Aalto, J., yrinen, J., Pelliniemi, L. J., and Finne, J.** (1998) The Polysialic Acid Units of the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM Form Filament Bundle Networks. *J.Biol.Chem.* 273, 28557-28559
90. **Troy, F. A.** (1979) The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Annu.Rev.Microbiol.* 33:519-60, 519-560
91. **Puente-Polledo, L., Reglero, A., Gonzalez-Clemente, C., Rodriguez-Aparicio, L. B., and Ferrero, M. A.** (1998) Biochemical conditions for the production of polysialic acid by *Pasteurella haemolytica* A2. *Glycoconj.J.* 15, 855-861
92. **Frosch, M. and Muller, A.** (1993) Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol.Microbiol.* 8, 483-493
93. **Jarvis, G. A. and Vedros, N. A.** (1987) Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect.Immun.* 55, 174-180
94. **Jarvis, G. A.** (1995) Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement. *Trends.Microbiol.* 3, 198-201
95. **Read, R. C., Zimmerli, S., Broaddus, C., Sanan, D. A., Stephens, D. S., and Ernst, J. D.** (1996) The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect.Immun.* 64, 3210-3217
96. **Swartley, J. S., Marfin, A. A., Edupuganti, S., Liu, L. J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J. D., and Stephens, D. S.** (1997) Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 271-276
97. **Chao, C. F., Chuang, H. C., Chiou, S. T., and Liu, T. Y.** (1999) On the biosynthesis of alternating alpha-2,9/alpha-2,8 heteropolymer of sialic acid catalyzed by the sialyltransferase of *Escherichia coli* Bos-12. *J.Biol.Chem.* 274, 18206-18212
98. **Hammerschmidt, S., Hilse, R., van Putten, J. P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., and Frosch, M.** (1996) Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* 15, 192-198
99. **Hammerschmidt, S., Müller, A., Sillmann, H., Mühlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W. D., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M.** (1996) Capsule phase variation in *Neisseria*

- meningitidis serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol.Microbiol.* 20, 1211-1220
100. **Kudo, M., Takayama, E., Tashiro, K., Fukamachi, H., Nakata, T., Tadakuma, T., Kitajima, K., Inoue, Y., and Shiokawa** (1998) Cloning and expression of an alpha-2,8-polysialyltransferase (STX) from *Xenopus laevis*. *Glycobiology.* 8, 771-777
101. **Sevigny, M. B., Ye, J., Kitazume-Kawaguchi, S., and Troy, F. A.** (1998) Developmental expression and characterization of the alpha2,8- polysialyltransferase activity in embryonic chick brain. *Glycobiology* 8, 857-867
102. **Inoue, S. and Iwasaki, M.** (1978) Isolation of a novel glycoprotein from the eggs of rainbow trout: occurrence of disialosyl groups on all carbohydrate chains. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 83, 1018-1023
103. **Nomoto, H., Iwasaki, M., Endo, T., Inoue, S., Inoue, Y., and Matsumura, G.** (1982) Structures of carbohydrate units isolated from trout egg polysialoglycoproteins: short-cored units with oligosialosyl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* 218, 335-341
104. **Inoue, S. and Iwasaki, M.** (1980) Characterization of a new type of glycoprotein saccharides containing polysialosyl sequence. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 93, 162-165
105. **Kanamori, A., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y.** (1989) Isolation and characterization of deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein (KDN-gp-OF) in the ovarian fluid of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 164, 744-749
106. **Kanamori, A., Kitajima, K., Inoue, Y., and Inoue, S.** (1991) Immunochemical probes for KDN and oligo/poly(KDN) structures in glycoconjugates. *Glycoconj.J.* 8, 222-223
107. **Inoue, Y.** (1993) Glycobiology of fish egg polysialoglycoproteins (PSGP) and deaminated neuraminic acid-rich glycoproteins (KDN-gp). In Roth, J., Rutishauser, U., and Troy, F. A., editors. *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, Birkhauser Verlag, Basel
108. **Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., and Roth, J.** (1992) Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J.Biol.Chem.* 267, 9965-9971
109. **James, W. M. and Agnew, W. S.** (1987) Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from *Electrophorus electricus*: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 148, 817-826
110. **Thiery, J. P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., and Edelman, G. M.** (1977) Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J.Biol.Chem.* 252, 6841-6845
111. **Walsh, F. S. and Doherty, P.** (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu.Rev. Cell Dev.Biol.* 13:425-56, 425-456
112. **Walsh, F. S. and Doherty, P.** (1991) Structure and function of the gene for neural cell adhesion molecule. *Seminars in The Neurosciences* 3, 271-284
113. **Nelson, R. W., Bates, P. A., and Rutishauser, U.** (1995) Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J.Biol.Chem.* 270, 17171-17179
114. **Livingston, B. D., Jacobs, J. L., Glick, M. C., and Troy, F. A.** (1988) Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J.Biol.Chem.* 263, 9443-9448
115. **Finne, J. and Mäkelä, P. H.** (1985) Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. *J.Biol.Chem.* 260, 1265-1270
116. **Kitajima, K., Kudo, M., Ono, Y., Inoue, S., and Inoue, Y.** (1995) A possible polysialylation signal in the core glycan chain of N-CAM. *Glycoconj.J.* 12, 508-509
117. **Fryer, H. J. and Hockfield, S.** (1996) The role of polysialic acid and other carbohydrate polymers in neural structural plasticity. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6, 113-118
118. **Hoffman, S. and Edelman, G. M.** (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 5762-5766

119. **Storms, S. D. and Rutishauser, U.** (1998) A role for polysialic acid in neural cell adhesion molecule heterophilic binding to proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 273, 27124-27129
120. **Yang, P., Yin, X., and Rutishauser, U.** (1992) Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J.Cell Biol.* 116, 1487-1496
121. **Doherty, P., Cohen, J., and Walsh, F. S.** (1990) Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 5, 209-219
122. **Landmesser, L., Dahm, L., Tang, J. C., and Rutishauser, U.** (1990) Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* 4, 655-667
123. **Yin, X., Watanabe, M., and Rutishauser, U.** (1995) Effect of polysialic acid on the behavior of retinal ganglion cell axons during growth into the optic tract and tectum. *Development* 121, 3439-3446
124. **Cremer, H., Chazal, G., Gordinis, C., and Represa, A.** (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol.Cell Neurosci.* 8, 323-335
125. **Rieger, F., Grumet, M., and Edelman, G. M.** (1985) N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *J.Cell Biol.* 101, 285-293
126. **Theodosis, D. T., Rougon, G., and Poulain, D. A.** (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 5494-5498
127. **Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D. A., and Theodosis, D. T.** (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 49, 419-436
128. **Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., and Scheff, S.** (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459
129. **O'Connell, A. W., Fox, G. B., Barry, T., Murphy, K. J., Fichera, G., Foley, A. G., Kelly, J., and Regan, C. M.** (1997) Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J.Neurochem.* 68, 2538-2546
130. **Shen, H., Watanabe, M., Tomasiewicz, H., Rutishauser, U., Magnuson, T., and Glass, J. D.** (1997) Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J.Neurosci.* 17, 5221-5229
131. **Roth, J. and Zuber, C.** (1990) Immunoelectron microscopic investigation of surface coat of Wilms tumor cells. Dense lamina is composed of highly sialylated neural cell adhesion molecule. *Lab Invest* 62, 55-60
132. **Glüer, S., Schelp, C., Gerardy-Schahn, R., and von Schweinitz, D.** (1998) Polysialylated neural cell adhesion molecule as a marker for differential diagnosis in pediatric tumors. *J.Pediatr.Surg.* 33, 1516-1520
133. **Kern, W. F., Spier, C. M., Miller, T. P., and Grogan, T. M.** (1993) NCAM (CD56)-positive malignant lymphoma. *Leuk.Lymphoma.* 12, 1-10
134. **Scheidegger, E. P., Lackie, P. M., Papay, J., and Roth, J.** (1994) In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab.Invest.* 70, 95-106
135. **Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L. B., and Luengo, J. M.** (1993) Polysialic acids. *Int.J.Biochem.* 25, 1517-1527
136. **Bliss, J. M., Garon, C. F., and Silver, R. P.** (1996) Polysialic acid export in Escherichia coli K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology.* 6, 445-452
137. **Eckhardt, M., Mühlhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., and Gerardy-Schahn, R.** (1995) Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* 373, 715-718
138. **Yoshida, Y., Kojima, N., and Tsuji, S.** (1995) Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung. *J.Biochem.(Tokyo)* 118, 658-664

139. **Phillips, G. R., Krushel, L. A., and Crossin, K. L.** (1997) Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 102, 143-155
140. **Nakayama, J., Fukuda, M. N., Fredette, B., Ranscht, B., and Fukuda, M.** (1995) Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 7031-7035
141. **Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y. C., and Tsuji, S.** (1995) Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett.* 360, 1-4
142. **Scheidegger, E. P., Sternberg, L. R., Roth, J., and Lowe, J. B.** (1995) A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 270, 22685-22688
143. **Tsuji, S., Datta, A. K., and Paulson, J. C.** (1996) Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* 6, v-vii
144. **Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., and Gerardy-Schahn, R.** (1996) Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr.Biol.* 6, 1188-1191
145. **Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., and Gerardy-Schahn, R.** (1996) Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J.* 15, 6943-6950
146. **Close, B. E. and Colley, K. J.** (1998) In Vivo Autopolysialylation and Localization of the Polysialyltransferases PST and STX. *J.Biol.Chem.* 273, 34586-34593
147. **Close, B. E., Tao, K., and Colley, K. J.** (2000) Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule. *J.Biol.Chem.* 275, 4484-4491
148. **Angata, K., Suzuki, M., McAuliffe, J., Ding, Y., Hindsgaul, O., and Fukuda, M.** (2000) Differential Biosynthesis of Polysialic Acid on NCAM and Oligosaccharide Acceptors by Three Distinct a2,8-Sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J.Biol.Chem.* [epub ahead of print]
149. **Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., and Tsuji, S.** (1995) Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain. *J.Biol.Chem.* 270, 14628-14633
150. **Lee, Y. C., Kim, Y. J., Lee, K. Y., Kim, K. S., Kim, B. U., Kim, H. N., Kim, C. H., and Do, S. I.** (1998) Cloning and expression of cDNA for a human Sia alpha 2,3Gal beta 1, 4GlcNA:alpha 2,8-sialyltransferase (hST8Sia III). *Arch.Biochem.Biophys.* 360, 41-46
151. **Ong, E., Nakayama, J., Angata, K., Reyes, L., Katsuyama, T., Arai, Y., and Fukuda, M.** (1998) Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology.* 8, 415-424
152. **Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., and Fukuda, M.** (1997) Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J.Biol.Chem.* 272, 7182-7190
153. **Kitagawa, H. and Paulson, J. C.** (1994) Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J.Biol.Chem.* 269, 17872-17878
154. **Kurosawa, N., Yoshida, Y., Kojima, N., and Tsuji, S.** (1997) Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. *J.Neurochem.* 69, 494-503
155. **Kojima, N., Tachida, Y., and Tsuji, S.** (1997) Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J.Biochem.(Tokyo.)* 122, 1265-1273
156. **Angata, K., Suzuki, M., and Fukuda, M.** (1998) Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *J.Biol.Chem.* 273, 28524-28532
157. **Nakayama, J. and Fukuda, M.** (1996) A human polysialyltransferase directs in vitro synthesis of polysialic acid. *J.Biol.Chem.* 271, 1829-1832

158. **Deutscher, S. L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E. I., and Hirschberg, C. B.** (1984) Translocation across Golgi vesicle membranes: a CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell* 39, 295-299
159. **Schiweck, W., Buxbaum, B., Schatzlein, C., Neiss, H. G., and Skerra, A.** (1997) Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: the V(H) domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. *FEBS Lett.* 414, 33-38
160. **Gerardy-Schahn, R., Bethe, A., Brennecke, T., Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Ziesing, S., Lottspeich, F., and Frosch, M.** (1995) Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E- encoded endoneuraminidase Endo NE. *Mol.Microbiol.* 16, 441-450
161. **Weisgerber, C. and Troy, F. A.** (1990) Biosynthesis of the polysialic acid capsule in Escherichia coli K1. The endogenous acceptor of polysialic acid is a membrane protein of 20 kDa. *J.Biol.Chem.* 265, 1578-1587
162. **Frosch, M., Gorgen, I., Boulnois, G. J., Timmis, K. N., and Bitter-Suermann, D.** (1985) NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 1194-1198
163. **Hirn, M., Pierres, M., Deagostini-Bazin, H., Hirsch, M., and Goriadis, C.** (1981) Monoclonal antibody against cell surface glycoprotein of neurons. *Brain Res.* 214, 433-439
164. **Gerardy-Schahn, R. and Eckhardt, M.** (1994) Hot spots of antigenicity in the neural cell adhesion molecule NCAM. *Int.J.Cancer Suppl.* 8:38-42, 38-42
165. **Moremen, K. W., Touster, O., and Robbins, P. W.** (1991) Novel purification of the catalytic domain of Golgi alpha-mannosidase II. Characterization and comparison with the intact enzyme. *J.Biol.Chem.* 266, 16876-16885
166. **Hammond, C. and Helenius, A.** (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* 126, 41-52
167. **Eckhardt, M., Gotza, B., and Gerardy-Schahn, R.** (1998) Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J.Biol.Chem.* 273, 20189-20195
168. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74, 5463-5467
169. **Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 7413-7417
170. **MacGregor, G. R. and Caskey, C. T.** (1989) Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 2365
171. **Kirley, T. L.** (1989) Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analyses. *Anal.Biochem.* 180, 231-236
172. **Holliday, R. and Ho, T.** (1990) Evidence for allelic exclusion in Chinese hamster ovary cells. *New Biol.* 2, 719-726
173. **Moremen, K. W. and Touster, O.** (1986) Topology of mannosidase II in rat liver Golgi membranes and release of the catalytic domain by selective proteolysis. *J.Biol.Chem.* 261, 10945-10951
174. **Mühlenhoff, M., Manegold, M., Windfuhr, M., Gotza, B., and Gerardy-Schahn, R.** (2000) The Importance of N-Glycans for Enzymatic Activity of the two Polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Eur.J.Cell Biol.* 79, 88
175. **Drickamer, K.** (1993) A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* 3, 2-3
176. **Becker, C.** (1999) Studien zur Regulation der Expression der humanen Gene für die α 2,8-Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV. *Doktorarbeit, Universität Hannover - Fachbereich Chemie*
177. **Wood, G. K., Liang, J. J., Flores, G., Ahmad, S., Quirion, R., and Srivastava, L. K.** (1997) Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 51, 69-81

178. **Hildebrandt, H., Becker, C., Murau, M., Gerardy-Schahn, R., and Rahmann, H.** (1998) Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J.Neurochem.* 71, 2339-2348
179. **Kojima, N., Tachida, Y., Yoshida, Y., and Tsuji, S.** (1996) Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation. *J.Biol.Chem.* 271, 19457-19463
180. **Kojima, H., Watanabe, Y., and Numata, O.** (1997) The dual functions of Tetrahymena citrate synthase are due to the polymorphism of its isoforms. *J.Biochem.(Tokyo.)* 122, 998-1003
181. **Windfuhr, M.** (1997) Studien zur Optimierung der rekombinanten Darstellung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in CHO-Zellen. *Diplomarbeit, Universität Hannover - Fachbereich Chemie*
182. **Fleischer, B., McIntyre, J. O., and Kempner, E. S.** (1993) Target sizes of galactosyltransferase, sialyltransferase, and uridine diphosphatase in Golgi apparatus of rat liver. *Biochemistry* 32, 2076-2081
183. **Roach, P. J. and Skurat, A. V.** (1997) Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 57, 289-316
184. **Smythe, C., Caudwell, F. B., Ferguson, M., and Cohen, P.** (1988) Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. *EMBO J.* 7, 2681-2686
185. **Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, S., Jeckel, D., and Aktories, K.** (1998) A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J.Biol.Chem.* 273, 19566-19572
186. **Wiggins, C. A. and Munro, S.** (1998) Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 7945-7950
187. **Cao, Y., Mahrenholz, A. M., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J.** (1993) Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J.Biol.Chem.* 268, 14687-14693
188. **Alonso, M. D., Lomako, J., Lomako, W. M., and Whelan, W. J.** (1994) Tyrosine-194 of glycogenin undergoes autocatalytic glucosylation but is not essential for catalytic function and activity. *FEBS Lett.* 342, 38-42
189. **Lin, A., Mu, J., Yang, J., and Roach, P. J.** (1999) Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. *Arch.Biochem.Biophys.* 363, 163-170
190. **Smythe, C., Watt, P., and Cohen, P.** (1990) Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur.J.Biochem.* 189, 199-204
191. **Cao, Y., Steinrauf, L. K., and Roach, P. J.** (1995) Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch.Biochem.Biophys.* 319, 293-298
192. **Alonso, M. D., Lomako, J., Lomako, W. M., and Whelan, W. J.** (1995) Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self- glucosylation. *J.Biol.Chem.* 270, 15315-15319
193. **Mu, J., Skurat, A. V., and Roach, P. J.** (1997) Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 272, 27589-27597
194. **Mu, J. and Roach, P. J.** (1998) Characterization of human glycogenin-2, a self-glucosylating initiator of liver glycogen metabolism. *J.Biol.Chem.* 273, 34850-34856
195. **Alvarez-Gonzalez, R., Watkins, T. A., Gill, P. K., Reed, J. L., and Mendoza-Alvarez, H.** (1999) Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol.Cell Biochem.* 193, 19-22
196. **Mendoza-Alvarez, H. and Alvarez-Gonzalez, R.** (1999) Biochemical characterization of mono(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry* 38, 3948-3953
197. **Mayer-Kuckuk, P., Ullrich, O., Ziegler, M., Grune, T., and Schweiger, M.** (1999) Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 259, 576-581
198. **Althaus, F. R., Kleczkowska, H. E., Malanga, M., Muntener, C. R., Pleschke, J. M., Ebner, M., and Auer, B.** (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol.Cell Biochem.* 193, 5-11

VI ANHANG

VI 1 cDNA-Sequenz der Hamster-PST (ST8SiaIV)

GCGACCGCCA CCTCCAATGC ACAAGGTGTC ACATTTGAAA AGAAACCTGA GCCCGGGGA GAAGGCGCTG
70

AGAGACCCTG GCCTGGCTAG TGCAAACCTGC GCGGCAGGGC GCTGGGCAGC CTGGAGAACC CAGAGAGCTC
140

CACCGCAGAC CATCCTAGCG ACCTGATTCT GGGATCTCGG CTCCACGCTC CCTTCGCAAT TTTCAGATTT
210

CTCTCCCTCG ATTATTTCCC CAAAACGGAA CCTTTATACC AAGAGAAGGT GCCGGAGCTG GGGCAACCAG
280

GACTTTCCCG GGCACCCAAG **ATG**CGCTCCA TTAGAAAACG GTGGACCATC TGCACTATAA GTCTACTTCT
350

GATCTTTTAT AAGACAAAAG AGATAGCCAG AACTGAGGAG CACCAAGAGA CGCAACTCAT CGGAGATGGT
420

GAATTGTGTT TGAGCAGATC ACTTGTCAAC AGCTCTGATA AAATCATTTCG GAAGGCTGGC TCAACCATCT
490

TCCAACATTC TGTACAAGGC TGGAGAATCA ATTCTTCTTT AGTCCTGGAG ATACGGAAGA ACATTCTCCG
560

TTTCTTAGAT GCTGAACGTG ATGTCTCTGT GGTCAAGAGC AGCTTCAAGC CTGGTGATGT CATCCACTAT
630

GTGTTGGACA GACGCCGGAC GCTAAATATT TCCCATGATC TGCACAGCCT CCTGCCTGAA GTTTCACCAA
700

TGAAAAACCG CAGGTTTAAG ACCTGTGCTG TTGTTGGAAA CTCTGGCATT CTACTIONGACA GTGGATGTGG
770

CAAGGAGATT GACAGTCACA ATTTTGTAAAT CAGGTGCAAT CTAGCTCCTG TGGTGGAGTT TGCTGCGGAT
840

GTGGGGACTA AATCAGATTT TATTACCATG AACCCATCAG TTGTGCAGAG AGCATTTGGA GGCTTTCGGA
910

ATGAGAGTGA CAGAGCAAAA TTTGTGCATA GACTTTCCAT GCTGAATGAC AGTGTCTTTT GGATCCCCGC
980

TTTCATGGTC AAAGGAGGAG AGAAGCACGT GGAATGGGTT AATGCATTAA TCCTTAAGAA CAAGCTGAAA
1050

GTGCGAACTG CCTATCCATC ACTGAGACTT ATTCATGCTG TCAGAGGTTA CTGGCTGACC AACAAAGTGC
1120

CCATCAAAAAG ACCCAGCACA GGCCTCCTCA TGTACACACT GGCCACCAGA TTTTGTGATG AAATTCACCT
1190

GTATGGGTTT TGGCCCTTCC CTAAGGATTT GAATGGAAAA GCTGTGAAAT ATCATTACTA CGATGACTTG
1260

AAATATAGAT ACTTTTCCAA CGCAAGCCCT CACAGAATGC CATTAGAATT CAAAACCTTG AATGTGCTAC
1330

ACAACAGAGG AGCACTAAAA CTGACCACAG GGAAGTGCAT GAAGCAAT**AA** AGCACATATT GAAGGATCAA
1400

VI 2 Aminosäuren, die in anderen Sialyltransferasen anstelle der in 2A10 mutierten Positionen vorkommen

Die den 2A10-Mutationen entsprechenden Positionen wurden größtenteils dem in Abb. 15 dargestellten Homologievergleich (Programm: DNASTar MegAlign) entnommen und gegebenenfalls auf die Enzyme anderer Spezies übertragen. In einigen Fällen, wie z.B. bei den α 2,6-Sialyltransferasen (ST6Gal und ST6GalNAc) im Bereich des VS-Sialylmotives ergab die individuelle Überarbeitung anhand der Homologievergleiche dieser Enzymgruppen unter sich eine von dem Homologievergleich aller Sialyltransferasen (Abb. 15) abweichende, aber stimmigere Zuordnung (siehe dazu auch IV 2.13). In der folgenden Tab. 11 sind beide Alternativen aufgeführt. Die an erster Position aufgeführte Aminosäure entstammt dabei dem überarbeiteten Sequenzvergleich.

Name des Enzyms	Zugangs-Nr.	Mutierte Positionen in 2A10-Zellen (Hamster-ST8SiaIV)							
		G146E	T189I	R277G	G281S	M284I	M333V	E336K	C356F
ST (Mensch)	U14550	G	G	M	G	M	L	E	-
ST3Gal (Mensch)	AB018356	G	M	V	G	A	V	E	G
ST3Gal (Mensch)	L23767	G	L	-	G	A	V	E	S
ST3Gal (Mensch)	L23768	G	I	I	G	A	I	E	S
ST3Gal (Mensch)	L13972	G	L	-	G	S	A	E	-
ST3Gal (Mensch)	AF059321	G	L	-	G	S	A	E	-
ST3Gal (Maus)	D28941	G	L	-	G	A	V	E	Y
ST3Gal (Maus)	AB013302	G	M	I	G	A	V	E	G
ST3Gal (Maus)	X73523	G	L	-	G	S	G	E	-
ST3Gal (Ratte)	M97754	G	I	I	G	A	I	E	S
ST3Gal (Schwein)	M97753	G	F	-	G	S	G	E	-
ST3Gal I (Huhn)	X80503	G	F	-	G	S	G	E	-
ST3Gal II (Mensch)	U63090	G	F	-	G	V	A	E	-
ST3Gal II (Maus)	X76989	G	F	-	G	V	A	E	-
ST3Gal II (Ratte)	X76988	G	F	-	G	V	A	E	-
ST3Gal III (Maus)	X84234	G	I	I	G	A	I	E	S
ST3Gal III (Goldhamster)	AJ245699	G	I	I	G	A	I	E	-
ST3Gal IV (Goldhamster)	AJ245700	G	L	-	G	A	V	E	-
ST3Gal V (Mensch)	AF105026	G	M	V	G	A	V	E	G
ST3Gal V (Maus)	Y15003	G	M	I	G	A	V	E	G
ST3Gal VI (Mensch)	AB022918	G	L	-	G	A	V	E	Q
ST6Gal I (Mensch)	X62822	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/H/-
ST6Gal I (Maus)	D16106	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/R/-
ST6Gal I, Variante (Ratte)	M83143	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/R/-
ST6Gal I (Ratte)	M18769	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/R/-
ST6Gal (Bos Taurus)	Y15111	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/R/-
ST6Gal I (Huhn)	X75558	S	L	P/-	G	G	L	E/G	C/H/-

Name des Enzyms (Fortsetzung)	Zugangs- Nr.	Mutierte Positionen in 2A10-Zellen (Hamster-ST8SiaIV)							
		G146E	T189I	R277G	G281S	M284I	M333V	E336K	C356F
ST6GalNAc I (Huhn)	X74946	G	G	R / -	G	L	F	E	-
ST6GalNAc II (Maus)	X93999	G	G	M / -	G	M	L	E	-
ST6GalNAc II (Huhn)	X77775	G	G	M / -	G	M	M	E	-
ST6GalNAc III (Maus)	Y11342	S	V	L / Y	G	T	F / W	E / K	-
ST6GalNAc III (Ratte)	L29554	S	V	L / Y	G	T	F / W	E / K	-
ST6GalNAc IV-Isolf. 1 (Maus)	Y15779	S	V	L / F	G	T	F / W	E / K	-
ST6GalNAc IV-Isolf. 2 (Maus)	Y15780	S	V	L / F	G	T	F / W	E / K	-
ST6GalNAc V (Maus)	AB030836	T	V	L / W	G	T	F / W	E / T	A
ST8Sia I (Mensch)	X77922	G	T	R	G	L	M	E	C
ST8Sia I (Mensch)	D26360	G	T	R	G	L	M	E	C
ST8Sia I (Maus)	X84235	G	T	R	G	L	M	E	C
ST8Sia I (Ratte)	U53883	G	T	R	G	L	M	E	C
ST8Sia I (Ratte)	D45255	G	T	R	G	L	M	E	C
ST8Sia II (Mensch)	NM_006011	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia II, Teil (Affe)	AF210318	G	T	R	G	M	M	E	?
ST8Sia II (Maus)	X83562	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia II (Ratte)	L13445	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia II (Xenopus)	AB007468	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia III (Mensch)	AF004668	G	T	R	G	M	L	E	C
ST8Sia III (Maus)	P.: A56950	G	T	R	G	M	L	E	C
ST8Sia IV (Mensch)	NM_005668	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia IV, Teil (Affe)	AF210729	G	T	R	G	M	?	?	?
ST8Sia IV (Maus)	X86000	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia IV, Teil (Ratte)	U90215	G	T	R	G	M	M	E	?
ST8Sia IV (Goldhamster)	AJ245701	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia IV (Huhn)	AF008194	G	T	R	G	M	M	E	C
ST8Sia V (Mensch)	U91641	G	T	R	G	L	M	E	C

Tab. 11: Auswahl einiger Sialyltransferasen mit den Zugangsnummern in der Gen-Datenbank unter Berücksichtigung der sich in diesen Enzymen anstelle der in 2A10-Klonen mutierten Positionen befindenden Aminosäuren.

VI 3 Tabellarische Zusammenstellung der bis jetzt klonierten eukaryontischen Sialyltransferasen

Nr.	Name des Enzyms	Zugangs-Nr.	Literaturangabe
1	ST (Mensch)	U14550	Sotiropoulou, direct submission (1994)
2	ST (Maus, putativ)	AJ007310	Lee et al; JBC 274 (17), 11958-11967 (1999)
3	ST3Gal (Mensch) (GM3-Synthase, SAT-1)	AB018356	Ishii et al; JBC 273 (48),31652-31655 (1998)
4	ST3Gal (Mensch) (SAT3)	L23767	Kitagawa, Paulson; JBC 269 (2), 1394-1401 (1994)
5	ST3Gal (Mensch) (SIAT6) => identisch zu 6	L23768	Kitagawa, Paulson; Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 375-382 (1993)

Nr.	Name des Enzyms (Fortsetzung)	Zugangs-Nr.	Literaturangabe
6	ST3Gal (Mensch) (SIAT6) => identisch zu 5	NM_006279	Kitagawa, Paulson; Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 375-382 (1993)
7	ST3Gal (Mensch) (SIAT4A) => identisch zu 14	L13972	Chang et al; Glycobiology 5 (3), 319-325 (1995)
8	ST3Gal (Mensch) (SIATFL)	AF059321	Shang et al; Eur. J. Biochem. 265 (2), 580-588 (1999)
9	ST3Gal (Maus)	D28941	Sasaki et al; unpublished (1994)
10	ST3Gal (Maus) (GM3-Synthase)	AB013302	Fukomoto et al; JBC 274 (14), 9271-9276 (1999)
11	ST3Gal (Maus) => identisch zu 15	X73523	Lee et al (Tsuji); Eur. J Biochem 216 (2), 377-385 (1993)
12	ST3Gal (Ratte)	M97754	Wen et al; JBC 267 (29), 21011-21019 (1992)
13	ST3Gal (Schwein)	M97753	Gillespie et al; JBC 267, 21004-21010 (1992)
14	ST3Gal I (Mensch) (hST3O-1) => identisch zu 7	L29555	Kitagawa et Paulson ; JBC 269, 17872-17878 (1994)
15	ST3Gal I (Maus) => identisch zu 11	X73523	Lee et al; Eur. J. Biochem. 216, 377-385 (1993)
16	ST3Gal I (Huhn)	X80503	Kurosawa et al; Biochim. Biophys. Acta 1244 (1), 216-222 (1995)
17	ST3Gal II (Mensch) => identisch zu 18	U63090	Kim et al; Biochem. Biophys. Res. Commun. 228 (2), 324-327 (1996)
18	ST3Gal II (Mensch) => identisch zu 17	X96667	Giordanengo et al; Eur. J. Biochem. 247 (2), 558-566 (1997)
19	ST3Gal II (Maus)	X76989	Lee et al ; JBC 269, 10028-10033 (1994)
20	ST3Gal II (Ratte)	X76988	Lee et al ; JBC 269, 10028-10033 (1994)
21	ST3Gal III (Maus) => identisch zu 22	X84234	Kono et al; Glycobiology in press
22	ST3Gal III (Maus) (Siat3) => identisch zu 21	NM_009176	Kono et al; Glycobiology in press (Jan 2000)
23	ST3Gal III (Goldhamster)	AJ245699	Grabenhorst et al; unpublished (Aug. 99)
24	ST3Gal IV (Mensch)	?	Verweis: cc, Biochem Biophys Res Commun 257 (2), 516-522 (1999)
25	ST3Gal IV (Goldhamster)	AJ245700	Grabenhorst et al; unpublished (Aug. 99)
26	ST3Gal V (Mensch)	AF105026	Kim et al (Lee), unpublished (1999)
27	ST3Gal V (Maus)	Y15003	Kono et al; Biochem. Biophys. Res. Commun. 253 (1), 170-175 (1998)
28	ST3Gal V (Maus)	AF119416	Kapitonov et al; Glycoconjugate J. 16, 337-350 (1999)
29	ST3Gal VI (Mensch, Melanom)	AB022918	Okajima et al; JBC 274 (17), 11479-86 (1999)
30	ST3Gal VI (Mensch)	AF119391	Kapitonov et al; Glycoconjugate J. 16, 337-350 (1999)
31	ST3Gal VI (Maus)	AF119390	Kapitonov et al; Glycoconjugate J. 16, 337-350 (1999)
32	ST6Gal I (Mensch) => identisch zu 33	X62822	Base et al; JBC 116 (2), 423-435 (1992)
33	ST6Gal I (Mensch) (SIAT1) => identisch zu 32	NM 003032	Base et al; JBC 116 (2), 423-435 (1992) (März 1999)
34	ST6Gal I (Maus)	D16106	Hamamoto et al; Bioorg. Med. Chem. 1 (2), 141-145 (1993)
35	ST6Gal I - Variante (Ratte)	M83143	Wen et al; JBC 267, 2512-2518 (1992)
36	ST6Gal I (Ratte)	M18769	Weinstein et al; JBC 262, 17735-17743 (1987)
37	ST6Gal I (Rind)	Y15111	Mercier et al; Glycobiology 9 (9), 851-863 (1999)
38	ST6Gal I (Huhn)	X75558	Kurosawa et al; Eur. J. Biochem. 219 (1-2), 375-381 (1994)
39	ST6GalNAc I (Mensch)	Y11339	Ikehara et al; Glycobiology 9 (11), 1213-1224 (1999)
40	ST6GalNAc I (Huhn)	X74946	Kurosawa et al; JBC 269 (2), 1402-1409 (1994)

Nr.	Name des Enzyms (Fortsetzung)	Zugangs-Nr. (GenBank)	Literaturangabe
41	ST6GalNAc I (Maus)	Y11274	Kurosawa et al; J Biochem 127(5), 845-854 (2000)
42	ST6GalNAc II (Maus)	X93999	Kurosawa et al; JBC 271, 15109-15116 (1996)
43	ST6GalNAc II (Huhn)	X77775	Kurosawa et al; JBC 269, 19048-19053 (1994)
44	ST6GalNAc II (Mensch)	AJ251053	Samyn-Petit et al; Biochim Biophys Acta 1474(2), 201-11 (2000)
45	ST6GalNAc III (Maus)	Y11342	Lee et al ; JBC 274 (17), 11958-11967 (1999)
46	ST6GalNAc III (Ratte)	L29554	Sjoberg et al. ; JBC. 271 (13), 7450-7459 (1996)
47	ST6GalNAc IV-Isolf.1 (Maus)	Y15779	Lee et al ; JBC 274 (17), 11958-11967 (1999)
48	ST6GalNAc IV-Isolf.2 (Maus)	Y15780	Lee et al ; JBC 274 (17), 11958-11967 (1999)
49	ST6GalNAc V (Maus)	AB030836	Okajima et al; JBC 274 (43), 30557-30562 (1999)
50	ST6GalNAc V (Maus)	AB028840	Ikehara et al; FEBS Lett 463 (1-2), 92-96 (1999)
51	ST6GalNAc VI (Maus)	NM_013443	Okajima et al; JBC 275 (10), 6717-6723 (2000)
52	ST8Sia I (Mensch) (GD3-Synthetase) (GD3/GT3-Syn.) =>	X77922 Protein: L43494	Sasaki et al; JBC. 269 (22), 15950-15956 (1994) Nakayama et al; JBC 271 (7), 3684-3691 (1996)
53	ST8Sia I (Mensch) (GD3-Synthase)	D26360 (15 AS kürzer als Nr. 54)	Nara et al; PNAS U.S.A. 91 (17), 7952-7956 (1994)
54	ST8Sia I (Maus) (GD3-Syn.)	X84235	Kono et al; JBC 271 (46), 29366-29371 (1996)
55	ST8Sia I (Ratte)	U53883	Zeng et al; Biochem. Biophys. Res. Commun. 226 (2), 319-323 (1996)
56	ST8Sia I (Ratte)	D45255	Watanabe et al; J. Biochem. 120 (5), 1020-1027 (1996)
57	ST8Sia II (Mensch) (SIAT8B)	NM_006011/ U82762	Scheidegger et al; JBC 270 (39), 22658-22688 (1995) Angata et al; JBC (1997)
58	ST8Sia II, Teil (african green monkey)	AF210318	Sevigny,M.B. and Troy,F.A. II., direct submission (Dez. 1999)
59	ST8Sia II (Maus)	X83562	Kojima et al; FEBS Lett. 360 (1), 1-4 (1995)
60	ST8Sia II (Ratte)	L13445	Livingston et al; JBC 268 (16), 11504-11507 (1993)
61	ST8Sia II (Xenopus laevis)	AB007468	Kudo et al ; Glycobiology, 8 , 771 -(1998)
62	ST8Sia III (Mensch)	AF004668	Lee et al; Arch. of Biochem. And Biophys., Vol. 360, No. 1, 1 st Dec., pg 41 – 46, 1998
63	ST8Sia III (Maus) => identisch zu 73	Protein: A56950/Q64689	Yoshida et al; JBC 270 (24), 14628-14633 (1995)
64	ST8Sia III (Maus) (5'-Ber.)	X93998	Yoshida et al; Glycobiology 6 (6), 573-580 (1996)
65	ST8Sia IV (Mensch)	NM_005668/ L41680	Nakayama et al; PNAS, 92 (15), 7031-7035 (1995) (Juni 1999)
66	ST8Sia IV, Teil (african green monkey)	AF210729	Sevigny,M.B. and Troy,F.A. II., direct submission (Dez. 1999)
67	ST8Sia IV (Maus)	X86000/ AJ223956	Yoshida et al; J. Biochem. (Tokio), 118(3), 658 – 64 (1995) bzw. Eckhardt, direct Submission
68	ST8Sia IV (Ratte)	U90215	Philips et al; Dev. Brain Res., 102, 143-155 (1997)
69	ST8Sia IV (Hamster)	Z46801	Eckhardt et al; Nature, 373, 715- (1995)
70	ST8Sia IV (Goldhamster)	AJ245701	Grabenhorst et al; unpublished (Aug. 99)
71	ST8Sia IV (Huhn)	AF008194	Bruses, Rollins, Rutishauser , unpublished (1998)
72	ST8Sia V (Mensch)	U91641	Kim et al; Biochem Biophys Res Commun. 235 (2), 327-330 (1997)
73	ST8Sia V (Maus) => identisch zu 63	X80502	Kono et al; JBC 271 (46), 29366-29371 (1996)
74	ST8Sia V (Ratte)	?	Zeng et al; Gene 187 (1):131-134 (1997)

Tab. 12: Tabellarische Zusammenstellung der bis jetzt klonierten Sialyltransferasen aus allen landlebenden Vertebraten mit Angabe der Zugangsnummer in der Gen-Datenbank und der entsprechenden Literaturstelle.

VI 4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michaela Windfuhr
Geburtsdatum	27.08.1972
Geburtsort	Dortmund
Eltern	Dr. Manfred und Christel Windfuhr
Adresse der Eltern	Auf der Papenburg 36 • 44801 Bochum • Telefon: (0234)702787
Geschwister	Dr. Claudia Windfuhr

Schulbildung

1978 - 1982	Grundschule, Bochum
1982 - 1991	Albert-Einstein-Gymnasium, Bochum
06/1991	Abitur

Studium

1991 - 1997	Studium Biochemie an der Universität Hannover
10/1993	Vordiplom
1994	Fortbildungslehrgang "Strahlenschutz" gemäß §6 StrSchV
03 - 05/1995	Praktikum am Department of Biochemistry and Biophysics, Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia
1995	Fortbildungslehrgang "Gentechnische Sicherheit" gemäß §15 GenTSV
11/1996 - 06/1997	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover zum Thema "Studien zur Optimierung der rekombinanten Darstellung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in CHO-Zellen"
06/1997	Diplom Hauptfach: Biophysikalische Chemie Nebenfach: Immunologie

Dissertation

08/1997	Beginn der experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover
---------	--

VI 5 Publikationen

Manegold A., Windfuhr M., Eckhardt M. and Gerardy-Schahn R. (1997) Molecular defects in 2A10 cells. *9th Joint Meeting of the "Groupe Lillois de Glycobiologie", the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" and the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM", Lille, France*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Eckhardt M. and Gerardy-Schahn R. (1998) Molecular characterization of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *XIX International Carbohydrate Symposium, San Diego, CA, USA*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Eckhardt M. and Gerardy-Schahn R. (1998) Molecular characterization of polysialyltransferases. *12th ESN-Meeting, St. Petersburg, Russia*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Eckhardt M. and Gerardy-Schahn R. (1998) Molecular characterization of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *International Conference on Poly Sialic Acids, France*

Windfuhr M., Manegold A., Mühlenhoff M. and Gerardy-Schahn R. (1998) Defects in the complementation group 2A10 concern both, the autocatalytic transfer of PSA to ST8SiaIV and the transfer of PSA to NCAM. *10th Joint Meeting of the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie", the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie", Nuland, Netherlands*

Windfuhr M., Manegold A., Mühlenhoff M. and Gerardy-Schahn R. (1999) Identification of catalytically important amino acid residues in ST8SiaII and ST8SiaIV. *11th Joint Meeting of the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM", the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie", Bonn, Germany*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Gotza B. and Gerardy-Schahn R. (1999) Importance of N-Glycanes for the enzymatic activity of the polysialyltransferases. *11th Joint Meeting of the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM", the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie", Bonn, Germany*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Gotza B. and Gerardy-Schahn R. (2000) Importance of N-Glycanes for enzymatic activity of the two polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Eur.J.Cell Biol. Supplement 50, Volume 79, pg. 88*

Windfuhr M., Manegold A., Mühlenhoff M., Eckhardt M. and Gerardy-Schahn R. (2000) Molecular defects that cause loss of polysialic acid in the complementation group 2A10. *J. Biol. Chem. (in press, article no.857700)*

Mühlenhoff M., Manegold A., Windfuhr M., Gotza B. and Gerardy-Schahn R. (2000) Importance of N-Glycanes for the activity of ST8SiaII and ST8SiaIV. *2nd International Symposium on Glycosyltransferases, Toronto, Canada*

Gerardy-Schahn R., Eckhardt M., Windfuhr M., Manegold A., Wang L., Mühlenhoff M., Bukalo O., Chazal G., Goridis C., Schachner M., Cremer H. and Dityatev A. (2000) PSA-Synthesis *in vivo*. *2nd International Symposium on Glycosyltransferases, Toronto, Canada*

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn, dass Sie mir die Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie ermöglicht hat und mich im Verlauf dieser Arbeit trotz vollem Terminkalender in vielen Diskussionen mit neuen Denkansätzen und Problemlösungsvorschlägen unterstützt hat. Außerdem hat sie es stets geschafft, die Motivation ihrer Mitarbeiter zusätzlich durch Aktivitäten abseits der täglichen Forschung, wie Kongressreisen, Weihnachtsessen oder Grillfeste, aufrechtzuerhalten.

Desweiteren möchte ich dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die vom Institut zur Verfügung gestellten Erleichterungen bei der täglichen Arbeit und für die unvergesslichen Betriebsausflüge danken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferates und die freundliche Unterstützung im Promotionsverfahren.

Bei der RGS'lern möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit, die täglichen Kaffeepausen, das Füttern von Zellen, die zumindest kurzfristig tolerierten Wechsel des Radiosenders, diverse Hochzeits-, Promotions- und Geburtstagsfeiern, gemeinsame Cocktails und besonders dafür, dass man sich immer aufeinander verlassen konnte, bedanken. Die wechselnde Besetzung im Labor 2500 bestand dabei namentlich aus: Christoph Becker, Andrea Bethe, Jean-Michel Brezun, Matthias Eckhardt, Patrizia Fricke, Birgit Gotza, Jens Klockgether, Arnd Manegold, Martina Mühlenhoff, Anja Münster, Kathrin Oelgeschläger, Stefan Oelmann, Kerstin Potthast, Ulrich Siegers, Katharina Stummeyer, Lihua Wang und Birgit Weinhold. Von den eben genannten möchte ich mich besonders bei Martina für die theoretische und praktische wissenschaftliche Unterstützung, bei Matthias für die Herstellung und Charakterisierung der Komplementationsgruppe 2A10 und damit für das Ausgangsmaterial dieser Arbeit, bei Arnd für die Vorarbeiten und die umfassende Einarbeitung und bei Anja und Stefan für die Korrektur des Manuskriptes bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für das angenehme Arbeitsklima, die freundliche Beantwortung diverser Fragen und die stetige Bereitschaft, die Suche nach verschiedensten Chemikalien, Laborartikeln oder Geräten aufzunehmen, bedanken.

Weiter bedanke ich mich für die Kooperation im Projekt zur Aufklärung der Disulfidbrücken bei Dr. Michael Jürgens und Martina Schulz-Knappe von der Firma BioVisioN in Hannover.

Hiermit versichere ich, Michaela Windfuhr, dass ich nicht gleichzeitig oder früher ein Promotionsverfahren an einer anderen Hochschule oder einem anderen Fachbereich beantragt habe. Weiterhin versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hannover, den 5. Juni 2000

Michaela Windfuhr