

**Molekulare Analyse von CHO-Zellen der
Komplementationsgruppe Lec8: Ableitung von
Struktur-Funktions-Beziehungen für den
UDP-Galactose Transporter**

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

von

Dipl.-Biochem. Stefan Oelmann
geboren am 22. Oktober 1973 in Bochum

2001

Referentin: Prof. R. Gerardy-Schahn

Korreferent: Prof. W. Müller

Tag der Prüfung: 02.05.2001

Schlagworte:

N-Glykosylierung, Zucker-Nukleotid Transporter, UDP-Galactose Transporter

Key words:

N-glycosylation, Nucleotide-sugar transporter, UDP-galactose transporter

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. ABSTRACT	2
3. EINLEITUNG.....	3
3.1. Die Biosynthese von N-Glykanstrukturen.....	3
3.2. Bedeutung und Aufgaben der Kohlenhydratanteile in Glykoproteinen	5
3.3. Die Polysialinsäure.....	6
3.4. Krankheitsbilder, die auf die fehlerhafte Biosynthese von Glykanstrukturen zurückzuführen sind: Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)	6
3.5. Komplementationsgruppen und Komplementationsklonierung.....	7
3.6. Zucker-Nukleotid Transporter	8
3.6.1. Biochemischer Nachweis von Zucker-Nukleotid Transportaktivität.....	8
3.6.2. Klonierung von Zucker-Nukleotid Transportern.....	9
3.6.3. Struktur-Funktions-Beziehungen der Zucker-Nukleotid Transporter	11
3.6.4. UDP-Galactose Transporter.....	13
3.7. Ziele der Arbeit.....	15
4. MATERIAL UND METHODEN	16
4.1. Material	16
4.1.1. Zelllinien.....	16
4.1.2. Bakterienstämme	16
4.1.3. Vektoren.....	16
4.1.4. Antikörper.....	17
4.1.4.1. Primärantikörper	17
4.1.4.2. Sekundärantikörper.....	17
4.1.5. Enzyme	17
4.1.6. Oligonukleotide	18
4.1.7. Chemikalien	22
4.1.8. Molekulargewichtsstandards.....	23
4.1.9. Nährmedien und Zusätze.....	23
4.1.10. Puffer	24
4.1.11. Sonstige Materialien.....	25
4.1.12. „Kits“	26
4.1.13. Geräte	26
4.1.14. Software.....	27
4.2. Methoden	28
4.2.1. Zellbiologische Methoden	28
4.2.1.1. Kultivierung von Zellen.....	28
4.2.1.2. Auftauen von Zellen	28
4.2.1.3. Einfrieren von Zellen	28
4.2.1.4. Anlagerung von Antikörpern an Petrischalen.....	28
4.2.1.5. Selektion von Zellen durch „Panning“	29
4.2.1.6. Transiente Transfektion mit Lipofectamine	29
4.2.1.7. Immunocytochemische Darstellung PSA-positiver Zellen.....	29
4.2.1.8. Immunfluoreszenz.....	30
4.2.2. Proteinchemische Methoden	31
4.2.2.1. Lysieren von Zellen.....	31

4.2.2.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
4.2.2.3.	Western Blot Analyse.....	31
4.2.2.4.	Entwicklung von Western Blots mit Antikörpern.....	32
4.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	32
4.2.3.1.	„Quick Checks“ von Plasmiden.....	32
4.2.3.2.	Analytische Plasmidpräparation.....	32
4.2.3.3.	Mini-Plasmidpräparation.....	33
4.2.3.4.	Midi-Plasmidpräparation.....	33
4.2.3.5.	Phenol/Chloroform Behandlung von DNA.....	33
4.2.3.6.	Präzipitation von DNA.....	34
4.2.3.7.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
4.2.3.8.	Agarosegelelektrophorese.....	34
4.2.3.9.	Southern Blot.....	35
4.2.3.10.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	35
4.2.3.11.	Endonukleaseverdau von DNA.....	35
4.2.3.12.	Dephosphorylierung von DNA.....	36
4.2.3.13.	Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotidadapttern.....	36
4.2.3.14.	Ligation von DNA.....	36
4.2.3.15.	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> DH5α.....	37
4.2.3.16.	Transformation von <i>E. coli</i> DH5α.....	37
4.2.3.17.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
4.2.3.18.	Gezielte Mutagenese von DNA.....	38
4.2.3.19.	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zelllinien.....	38
4.2.3.20.	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA.....	39
4.2.3.21.	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	39
4.2.3.22.	Northern Blot.....	39
4.2.3.23.	Methylenblaufärbung von RNA-Markern.....	40
4.2.3.24.	RT-PCR.....	40
4.2.3.25.	Amplifizierung von 5'-Enden (5'-RACE).....	41
4.2.3.26.	Markierung von Sonden mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG).....	41
4.2.3.27.	Hybridisierungen.....	42
4.2.3.28.	Sequenzierung.....	43
5.	ERGEBNISSE.....	44
5.2.	Vergleichende Sequenzanalyse des Hamster UGT.....	46
5.1.	Klonierung des Hamster UGT.....	44
5.3.	Membrantopologie-Modell des Hamster UGT.....	47
5.4.	Nachweis der Expression des Hamster UGT.....	48
5.5.	Nachweis der Aktivität des Hamster UGT.....	49
5.6.	Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Hamster UGT.....	51
5.7.	Nachweis von Hamster UGT mRNA im Northern Blot.....	52
5.8.	5'-RACE und Bestimmung des potentiellen Transkriptionsstarts.....	53
5.9.	Analyse der Komplementationsgruppe Lec8.....	53
5.9.1.	Northern Blot Analyse der Komplementationsgruppe Lec8.....	54
5.9.2.	Untersuchung der Komplementationsgruppe Lec8 über RT-PCR.....	55
5.9.3.	Konservierung der in Lec8-Klonen gefundenen Punktmutationen.....	57
5.9.4.	Herstellung und Nachweis der Expression <i>lec8</i> -mutierter Sequenzen des Hamster UGT und des Maus CST.....	58
5.9.5.	Bestimmung der subzellulären Lokalisation von <i>lec8</i> -mutierten Fusionsproteinen des Hamster UGT und des Maus CST.....	59

5.9.6.	Nachweis funktioneller Aktivität von <i>lec8</i> -mutierten Fusionsproteinen des Hamster UGT und des Maus CST	61
5.10.	Studien zur Qualität der <i>lec8</i> -mutierten Aminosäuren	62
5.11.	Auswahl der Rezipientenzelllinie für den Nachweis der UGT-Aktivität.....	64
5.12.	Genomische Organisation des UGT	65
5.13.	Untersuchung der Membrantopologie des Hamster UGT	68
5.13.1.	Bestimmung der Lokalisation der Termini des Hamster UGT	68
5.13.2.	Untersuchung der Membrantopologie des Hamster UGT durch die Insertion von Epitopen	70
5.13.3.	Untersuchung der Membrantopologie durch Verkürzung des Hamster UGT	73
5.13.4.	Untersuchung der Membrantopologie und Definition funktionell wichtiger Domänen durch Herstellung von Chimären zwischen dem Hamster UGT und dem Maus CST	75
5.14.	Untersuchung eines potentiellen ER-Rückhaltesignals am C-Terminus des Hamster UGT	76
5.15.	Lokalisation von zwei <i>Arabidopsis thaliana</i> UGT	78
6.	DISKUSSION	80
6.1.	Isolierung eines neuen Mitglieds der UGT Familie.....	80
6.2.	Analyse von CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec8.....	81
6.3.	Topologie des Hamster UGT	84
6.4.	Studien zu den UGT aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
6.5.	Ausblick.....	86
7.	LITERATURVERZEICHNIS	87
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
ANHANG	96	
DANKSAGUNGEN	97	
LEBENS LAUF	98	
PUBLIKATIONEN	99	
ERKLÄRUNG	100	

1. ZUSAMMENFASSUNG

Zucker-Nukleotid Transporter sind essentielle Faktoren bei der Herstellung glykosylierter Strukturen. Die Zucker-Nukleotid Transporter stellen die Substrate für zahlreiche luminal orientierte Glycosyltransferasen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi-Apparats bereit. Die ersten Vertreter dieser Proteinklasse wurden 1996 kloniert und funktionell charakterisiert. Auf der Basis der vorhandenen Sequenzinformation war die Klonierung des Hamster UDP-Galactose Transporters (UGT) über einen Homologiezugang möglich. Die neu isolierte cDNA kodiert für ein stark hydrophobes Typ III Membranprotein. In computergestützten Topologievorhersagen werden zehn potentielle Transmembrandomänen vorgeschlagen. Um Informationen zu Struktur-Funktions-Beziehungen für den Hamster UGT abzuleiten, wurden die molekularen Ursachen für die Inaktivierung des UGT in Zellen der Komplementationgruppe Lec8 untersucht, die einen Defekt im UGT besitzen. In Northern Blot und RT-PCR Analysen wurde die Existenz einer mRNA in Lec8-Zellen überprüft. Eine stabile mRNA wurde in vier der neun untersuchten Klone gefunden. Die Sequenzierung der über PCR amplifizierten Gene führte zur Identifizierung von drei Punktmutationen (Δ Ser213, Gly281Asp, Tyr122His). Im Gen des vierten untersuchten Klons wurde eine große Deletion in der UGT-cDNA identifiziert, die eine Verschiebung des Leserasters und Einführung eines vorzeitigen Stops bedingt. Da die identifizierten Punktmutationen Teil von Primärsequenzabschnitten sind, die in allen bislang aus Säugetierspezies klonierten Zucker-Nukleotid Transportern konserviert sind, wird angenommen, dass ihre Funktion für die Architektur dieser Proteine oder einer allen Transportern gemeinsamen Eigenschaft notwendig ist. Entsprechend konnte der Maus CMP-Sialinsäure Transporter durch gleichgerichtete Veränderungen inaktiviert werden.

Mit Hilfe einer Insertionsmutagenese und durch Herstellung von C- und N-terminalen Verkürzungen wurde die Topologie des Hamster UGT untersucht. Dabei wurde die Orientierung der inserierten Epitope im Verhältnis zur Golgi-Membran bestimmt. Nur einige der Epitope konnten eindeutig dargestellt werden. Die bislang erhaltenen Daten stimmen mit dem vorausgesagten Membrantopologie-Modell des UGT sehr gut überein. Die untersuchten N- und C-terminalen Verkürzungen des Transporters zeigten, dass die cytoplasmatisch gelegenen Proteintermini für die Funktion des UGT und die subzelluläre Lokalisation im Golgi-Apparat verzichtbar sind. Allerdings befindet sich im C-Terminus des Hamster UGT ein potentielles ER-Rückhaltesignal K(X)KXX. Die Funktion des Signals konnte in Immunfluoreszenzstudien bestätigt werden.

2. ABSTRACT

Nucleotide-sugar transporters (NST) are essential factors for the synthesis of glycosylated structures. NST provide the substrate for many lumenally orientated glycosyltransferases in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi-Apparatus. The first member of this new class of proteins was cloned and characterized in 1996. On the basis of the available sequence-information cloning of the hamster UDP-galactose transporter (UGT) became possible via a homology approach. The isolated cDNA encodes a highly hydrophobic type III membrane protein. Using a computer-based topology-search ten potential transmembrane domains were predicted. In order to deduce structure-function-relationships for the hamster UGT, the molecular basis for the inactivation of the UGT in cells of the Lec8 complementation group, which carry a defect in the UGT, was analyzed. The presence of mRNA in these cells was confirmed by Northern blot and RT-PCR analyses. A stable mRNA was found in four out of nine individual clones. Sequencing of the amplified genes revealed three point-mutations (Δ Ser213, Gly281Asp, Tyr122His). In the fourth clone a large deletion in the UGT-cDNA was identified, which led to a frameshift and a premature stop. The identified point mutations are part of primary sequence stretches being highly conserved among the NST from mammals. The mutated amino acids are probably essential for the proteins' architecture or another feature common in all NST. Accordingly, similar mutations in the murine CMP sialic-acid transporter led to identical phenotypes.

Using an epitope-insertion-approach and N- and C-terminal truncations the topology of the hamster UGT was analyzed. The orientation of the inserted epitopes in relation to the Golgi-membrane was determined. Only six epitopes could clearly be localized. The data corresponded to the predicted model of the hamster UGT. N- and C-terminal truncations showed that the tails localized in the cytoplasm are dispensable for UGT function and subcellular localization in the Golgi-Apparatus. On the other hand a potential C-terminal ER-retention signal has been identified in the hamster UGT. Its function was confirmed in immunofluorescence studies.

3. EINLEITUNG

3.1. Die Biosynthese von N-Glykanstrukturen

Die Glykosylierung von Proteinen kann in tierischen Zellen auf drei Wegen geschehen: durch N-Glykosylierung über Amidbindung an die γ -Aminogruppe eines Asparaginrests (Asn) (Kornfeld und Kornfeld, 1985), durch O-Glykosylierung über Hydroxygruppen von Serin (Ser)-, Threonin (Thr)- oder 5-Hydroxylysinresten (Schachter und Roseman, 1980) oder über Amidbindung an die C-terminale Aminosäure einer Peptidkette (Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine (Eckert *et al.*, 1997)).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Klonierung und Analyse des Hamster UDP-Galactose Transporters, eines Faktors entlang des Biosynthesewegs komplexer N-Glykanstrukturen. Im Folgenden wird deshalb die N-Glykosylierung von Proteinen ausführlich beschrieben.

Die N-Glykosylierung von Proteinen findet ausschließlich an Asparaginresten statt, die Teil einer definierten Akzeptorsequenz sind. Die Sequenz lautet Asn-X-Ser/Thr, wobei X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin und Asparaginsäure steht. Ort der Synthese und Reifung der Glykoproteine sind die Kompartimente des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats. Die Synthese findet entlang des Biosynthesewegs sekretorischer Proteine statt. Auf der cytoplasmatischen und später auf der luminalen Seite des rauen ERs wird ein Oligosaccharid der Summenformel (Glucose₃Mannose₉N-Acetylglucosamin₂; „Core“-Struktur) an Dolicholpyrophosphat synthetisiert. Das Oligosaccharid wird dann co-translational im ER durch ein Oligosaccharid-Transfer-Enzym über eine N-glykosidische Bindung auf die γ -Aminogruppe des Asparagins übertragen. Das Oligosaccharid wird anschließend durch spezifische Glykosidasen partiell abgebaut. Das Glykoprotein wird dann in die *cis*-Zisternen des Golgi-Apparats transportiert. Dort werden weitere Mannosereste abgespalten bis eine Struktur der Summenformel Mannose₅N-Acetylglucosamin₂ entstanden ist. Diese Struktur ist der Vorläufer von hybriden und komplexen N-Glykanstrukturen. In den medialen- und trans-Zisternen des Golgi-Apparats reifen durch weitere Anlagerungen und Abspaltungen von Zuckerresten die unterschiedlichen Glykanstrukturen. Die entstehenden Kohlenhydratstrukturen sind das Ergebnis der spezifischen enzymatischen

Ausstattung der Zelle. Die an der Reifung der Glycanstrukturen beteiligten Faktoren sind linear entlang den Kompartimenten des ERs und Golgi-Apparats angeordnet. Die beiden letzten Schritte bei der Bildung einer komplexen N-Glykanstruktur, die Galactosylierung und Sialylierung, sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

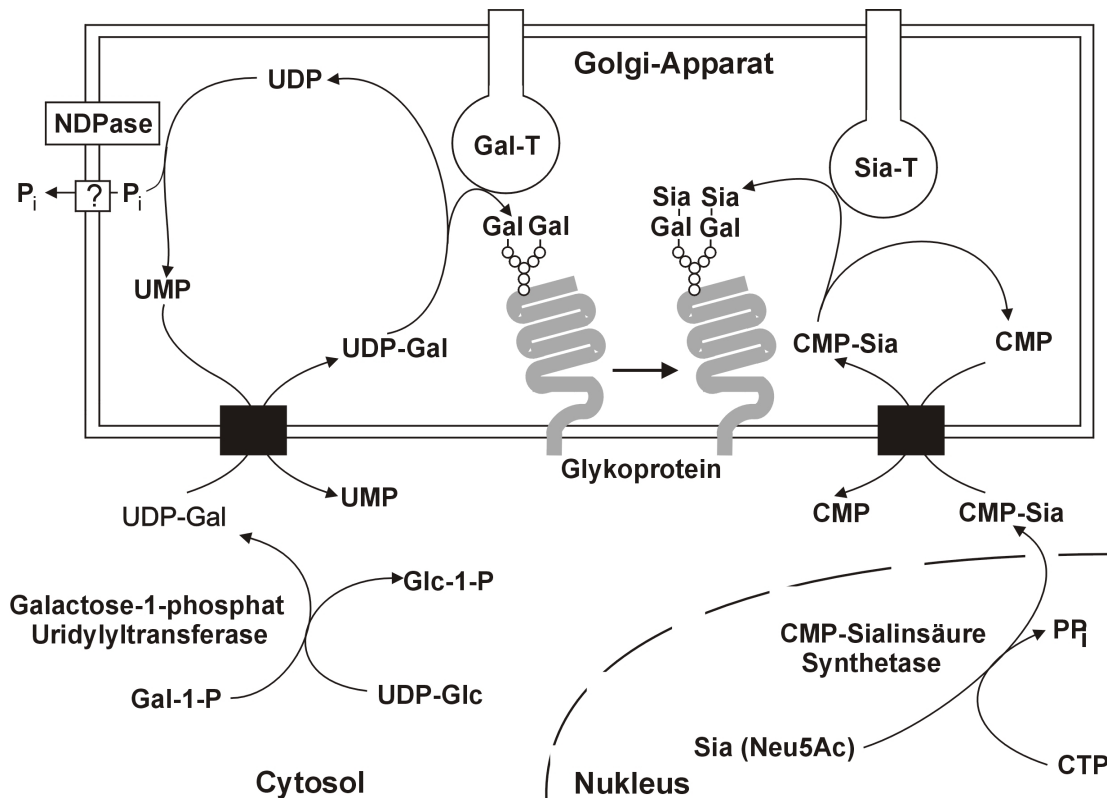


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Galactosylierung und Sialylierung im Golgi-Apparat (Gerardy-Schahn und Eckhardt, 2000).

Anhand dieses Schemas wird das Zusammenspiel einiger an der N-Glykosylierung beteiligter Faktoren veranschaulicht: die Synthetasen im Cytosol, bzw. im Fall der CMP-Sialinsäure Synthetase im Zellkern (Kean, 1991; Münster *et al.*, 1998), aktivieren spezifisch die Zuckermoleküle durch Verknüpfung mit einem Nucleosidmono- oder Diphosphat (z.B. UDP-Galactose oder CMP-Sialinsäure). Die Transferasen (Gal-T und Sia-T in Abbildung 1) im Golgi-Apparat katalysieren spezifisch die Verknüpfung der aktivierten Zucker mit dem naszierenden Oligosaccharid. Die Zucker-Nucleotid Transporter (schwarze Rechtecke in Abbildung 1) sind in der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert und transportieren spezifisch die im Cytosol bereitgestellten aktivierten Zucker in den Golgi-Apparat, wo sie dann als Substrate für die Transferasen zur Verfügung stehen. Durch die

Kompartimentierung der Zelle, die Voraussetzung für die Glykosylierungsreaktion ist, wird die Aktivierung der Zucker im Cytosol bzw. Zellkern räumlich von den Transferasereaktionen im Golgi-Apparat getrennt. Diese räumliche Trennung wird durch die Zucker-Nukleotid Transporter überwunden. Die Transporter sind somit essentielle Faktoren bei der N-Glykosylierung.

Neben den in Abbildung 1 gezeigten und im Text genannten Faktoren sind viele weitere Faktoren beteiligt, die unter anderem für den vektoriellen Transport des Proteins sowohl innerhalb der Kompartimente als auch zwischen den Kompartimenten verantwortlich sind.

3.2. Bedeutung und Aufgaben der Kohlenhydratanteile in Glykoproteinen

Die Kohlenhydratanteile sind für viele Eigenschaften der Glykoproteine entscheidend. So wird die Löslichkeit, Stabilität, antigene Wirkung und biologische Aktivität über die Glykosylierungsmuster des Proteins beeinflusst (Varki, 1993; Zhang *et al.*; 1997; Dwek, 1995a; Dwek, 1995b). Die Glykane, insbesondere die im ER gebildeten Strukturen, sind darüber hinaus an der Faltung, Qualitätskontrolle und an intrazellulären Transport- und Sortierungsprozessen beteiligt (Pfeffer und Rothman, 1987; Helenius und Aebi, 2001).

Die Kohlenhydratanteile von Glykoproteinen und Glykolipiden bilden einen dichten Saum auf den Oberflächen von tierischen Zellen. Diese sogenannte Glykocalyx ist an vielfältigen biologischen Vorgängen beteiligt, spezifische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen werden durch sie vermittelt und reguliert (Crocker und Feizi, 1996). Glykostrukturen sind im Zentralnervensystem an plastischen Vorgängen beteiligt (Schachner und Martini, 1995; Muller *et al.*, 1996). Ein weiterer Aspekt ist die Erkennung der Zellen durch Pathogene wie Bakterien und Viren (Kelm und Schauer, 1997; Herrler *et al.*, 1995). Auf Tumorzellen wurden veränderte Glykosylierungsmuster beobachtet. Durch die veränderten Oberflächen können sowohl die Tumorzellwachstum wie metastatisches Potential beeinflusst werden (Dennis *et al.*, 1986; Taki *et al.*, 1991). Schließlich können Glycotope als Tumormarker dienen (Fukuda, 1996).

3.3. Die Polysialinsäure

Die Polysialinsäure (PSA) ist ein lineares Homopolymer aus α -2,8-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren (Rougon, 1993). In Eukaryoten ist die PSA eine dynamisch regulierte posttranslationale Modifikation. Die PSA ist dort meist an die fünfte Ig-ähnliche Domäne des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) gebunden. Sie kommt aber auch an den Polysialoglykoproteinen (PSGP) in Fischeiern und an der α -Untereinheit des Natriumkanals im Rattenhirn vor (Zuber *et al.*, 1992). In humanpathogenen Bakterien wie *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis* Serogruppe B bildet die PSA das Kapselpolysaccharid. Das gleichzeitige Auftreten von PSA als Kapselpolysaccharid bei Bakterien und als körpereigene Struktur erklärt die schwache Immunogenität dieser neuroinvasiven Bakterien.

Damit PSA als terminale Modifikation des NCAM gebildet werden kann, müssen reife komplexe N-Glykane vorliegen. Das Auftreten polysialylierter NCAM-Formen ist daher ein sehr guter Indikator für die funktionelle Aktivität aller an der N-Glykosylierung beteiligten Faktoren. Für den spezifischen Nachweis von PSA stehen zwei Hilfsmittel zur Verfügung: zum einen können PSA-Ketten ab einer Länge von acht Resten mit dem monoklonalen Antikörper 735 spezifisch nachgewiesen werden (Frosch *et al.*, 1985). Zum anderen können mit Hilfe des Phagenenzym Endoneuraminidase NE (Endo NE) PSA-Ketten ab einer Länge von acht Resten spezifisch geschnitten werden. Nach dem Verdau mit Endo NE kann der Antikörper 735 das PSA-Epitop z.B. auf NCAM nicht mehr erkennen.

3.4. Krankheitsbilder, die auf die fehlerhafte Biosynthese von Glykanstrukturen zurückzuführen sind: Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen vielfältigen Funktionen der Kohlenhydratanteile für die Glykoproteine ist es naheliegend, dass Eingriffe in diese Strukturen schwerwiegende Folgen für die Zelle bzw. den Organismus haben. Unter dem Begriff „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) sind Krankheiten zusammengefasst, die sich durch genetische Defekte in Faktoren auszeichnen, die an der Glykosylierung beteiligt sind (Grunewald und Matthijs, 2000). Der erste Patient wurde 1980 beschrieben und es gibt bis heute nur eine relativ kleine Anzahl an Patienten. Dies spricht dafür, dass eine vollständige Inaktivierung von Faktoren,

die an der Glykosylierung beteiligt sind, normalerweise nicht mit dem Leben vereinbar ist und dass nur solche Fälle gefunden werden, bei denen die betroffenen Faktoren noch Restaktivität besitzen. Diagnostiziert werden die CDG durch das Wanderungsverhalten des humanen Serumtransferrins in der isoelektrischen Fokussierung. Transferrin ist ein Glykoprotein mit zwei N-Glykosylierungsstellen, die im Normalfall identisch glykosyliert sind. Ist das Protein bei CDG-Patienten nicht vollständig glykosyliert, so wird dies durch ein verändertes Wanderungsverhalten in der isoelektrischen Fokussierung deutlich. Bislang wurden 8 Formen (Typen) des CDG beschrieben. 1999 wurden die in zwei Gruppen, CDG I und CDG II, eingeteilt. Unter CDG I sind genetische Defekte von Enzymen zusammengefasst, die das Oligosaccharid an Dolicholpyrophosphat synthetisieren bzw. die am Transfer des Oligosaccharids auf die Seitenkette des Asparagin beteiligt sind. Unter CDG II sind alle Defekte von Enzymen, die an der weiteren Reifung beteiligt sind, zusammengefasst. CDG Ia bezeichnet beispielsweise einen Defekt in der Phosphomanno-Mutase, CDG Ib einen der Phosphomanno-Isomerase und CDG Ic einen der α -1,3-Glucosyltransferase. Kürzlich wurde eine neue Form des CDG II (CDG IIc) gefunden, dem eine vermutlich partielle Inaktivierung des GDP-Fucose Transporters zugrunde liegt (Lubke *et al.*, 1999).

Die Symptomatik dieser Krankheitsbilder ist sehr vielfältig. Häufig treten schwere Schädigungen des Nervensystems, frequente Infektionen, psychomotorische Retardierung und Entwicklungsstörungen auf.

3.5. Komplementationsgruppen und Komplementationsklonierung

In sogenannten Komplementationsgruppen werden individuelle Mutanten einer Zelllinie zusammengefasst, die Defekte im gleichen Gen haben. Im Rahmen dieser Arbeit sind Komplementationsgruppen mit Glykosylierungsmutanten von besonderem Interesse. Glykosylierungsdefiziente Zellen sind hauptsächlich für die „Chinese Hamster Ovary“ (CHO)-Zellen bekannt. Dabei wurde die Mehrzahl der Mutanten aufgrund der veränderten Bindung an Pflanzenlektine identifiziert und selektiert (Stanley und Siminovitch, 1977). CHO-Zellen sind funktionell haploid, d.h. ein Allel des diploiden Chromosomensatzes ist durch Methylierung inaktiviert. Diese Tatsache erklärt die Häufigkeit, mit der genetische Defekte in CHO-Zellen gefunden werden. Da, wie oben beschrieben, das Fehlen von Glycotopen mit einer

Veränderung in der Lectinbindung der Zellen einhergeht, wurden die Mutanten als „Lec“-Mutanten bezeichnet. Die Komplementationsgruppen wurden durchnummeriert. Bislang sind mehr als vierzig Lec-Varianten identifiziert. Diese Komplementationsgruppen wurden seit den siebziger Jahren zur Analyse der Biosynthese von Glykanstrukturen verwendet (Stanley, 1993). Zellen aus verschiedenen Komplementationsgruppen wurden auch für sogenannte Komplementations- oder Expressionsklonierungen eingesetzt. Dabei wurden DNA-Banken oder einzelne DNA-Konstrukte in die Zellen transfiziert. Über die Korrektur des Defekts der verwendeten Komplementations-gruppe konnten einzelne an der Glykosylierung beteiligte Faktoren isoliert werden.

3.6. Zucker-Nukleotid Transporter

3.6.1. Biochemischer Nachweis von Zucker-Nukleotid Transportaktivität

Zucker-Nukleotid Transporter sind seit den siebziger Jahren aus biochemischen Untersuchungen bekannt (Kuhn und White, 1976; Perez und Hirschberg, 1987). Zu ihrem Nachweis wurden Mikrosomenfraktionen aus Rattenleberzellen isoliert und mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Anschließend wurde der Eintransport von Substrat in die Mikrosomenvesikel über die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Bei diesen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass beim Eintransport der Zucker-Nukleotide in den Golgi-Apparat ein Nukleosidmonophosphat als Gegensubstrat transportiert wird. (Capasso und Hirschberg, 1984). Der Austransport von Nukleosidmonophosphat entlang des Konzentrationsgradienten wird als treibende Kraft für die Anreicherung der Zucker-Nukleotide in den Vesikeln postuliert. Der Transport ist temperaturabhängig, substratspezifisch und sättigbar bei einer 50-100fachen Anreicherung des Substrats (Hirschberg und Snider, 1987). Die Lokalisation der Zucker-Nukleotid Transporter konnte durch Transportuntersuchungen verschiedener Membranfraktionen bestimmt werden. Im Golgi-Apparat wurden Transportaktivitäten für UDP-Galactose, GDP-Fucose und CMP-Sialinsäure identifiziert (Sommers und Hirschberg, 1982). Transporteraktivitäten für UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-N-Acetylgalactosamin, UDP-Xylose und UDP-Glucuronsäure wurden sowohl im Golgi-Apparat als auch im ER identifiziert (Perez und Hirschberg, 1985; Abeijon und Hirschberg, 1987; Nuwayhid *et al.*, 1986). Transportaktivität für UDP-Glucose wurde hauptsächlich im ER gefunden (Perez und Hirschberg, 1986).

3.6.2. Klonierung von Zucker-Nukleotid Transportern

1996 wurden die ersten Zucker-Nukleotid Transporter durch die oben beschriebene Komplementationsklonierung mit Hilfe von Zelllinien isoliert, die einem Defekt für den entsprechenden Zucker-Nukleotid Transporter haben (Abeijon *et al.*, 1997; Kawakita *et al.*, 1998). Über Homologieansätze (PCR, homologe Sonden) wurden weitere Transporter isoliert (Berninsone und Hirschberg, 2000). Alle bisher klonierten Transporter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei allen Transportern handelt es sich um Typ III Membranproteine mit einer Größe von 34-42 kDa. Insgesamt besteht eine hohe Konservierung zwischen den Spezies. Säugetiertransporter besitzen untereinander eine Identität von 40-50%, die Identität von Säugetier- zu Hefe- bzw. Protozoentransporter beträgt etwa 11-15%. Ein Sequenzvergleich aller bisher klonierten Zucker-Nukleotid Transporter ist in Abbildung 2 dargestellt.

Nukleotid-Zucker Transporter	Referenz	GeneBank Nummer
Humaner UGT1	(Miura <i>et al.</i> , 1996)	D84454
Humaner UGT2	(Ishida <i>et al.</i> , 1996)	D88146
Maus UGT	(Ishida <i>et al.</i> , 1999a)	AB027147
<i>S. pombe</i> UGT	(Segawa <i>et al.</i> , 1999)	AB023425
Humaner UGlcNAcT	(Ishida <i>et al.</i> , 1999b)	AB021981
Hunde UGlcNAcT	(Guillen <i>et al.</i> , 1998)	AF057365
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	(Abeijon <i>et al.</i> , 1996)	U48413
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	(Roy <i>et al.</i> , 2000)	U18530
Humaner CST	(Ishida <i>et al.</i> , 1996)	D87969
Hamster CST	(Eckhardt und Gerardy-Schahn, 1997)	Y12074
Maus CST	(Eckhardt <i>et al.</i> , 1996)	Z71268
<i>S. cerevisiae</i> GMT	(Dean <i>et al.</i> , 1997)	L33915
<i>L. donovani</i> GMT	(Ma <i>et al.</i> , 1997)	U26175

Tabelle 1: Zusammenfassung aller bisher klonierten Zucker-Nukleotid Transporter mit ihrer Zugangsnummer in der Datenbank. UGT: UDP-Galactose Transporter, UGlcNAcT: UDP-N-Acetylglucosamin Transporter, CST: CMP-Sialinsäure Transporter, GMT: GDP-Mannose Transporter

Humaner UGT1	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLLKYYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLP--GDRFFAT	69
Humaner UGT2	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLLKYYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLP--GDRFFAT	69
Maus UGT	MAAVGVGGSTAAGAGAVSSGAGALEPGSTAAHRRLLKYYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLP--GDRFFAT	69
<i>S. pombe</i> UGT	MAVKGGDDVKWKGIP-----MKYIALVLLTVQNSALILTLNYSRIMPGYDDKDRYFST	52
Humaner UGlcNAcT	MFA-----NLKYYVSGILVVFQTSLSVLTMRYSRTLKE-EGPRYLSST	41
Hunde UGlcNAcT	MST-----NLKYYVSGILVVFQTSLSVLTMRYSRTLKE-EGPRYLSST	41
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	M-----SFVL-ILS---LVFGCCSNVISFHEM-VQGSNINLGNIVTFTQ-----FVSVT	45
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	M-----WNSLKAFALVFGCCSNVITFETL-MSNETGSINNLITFCQ-----FLFVT	46
Humaner CST	M-----AAPRDNVTL-----LFKLYCLAVMTLMAAVYTIALRYTRTSDK-E--LYFST	46
Hamster CST	M-----AQARENVSLL-----FFKLYCLAVMTLVAAAYTVLALRYTRTAK-E--LYFST	46
Maus CST	M-----APARENVSLL-----FFKLYCLAVMTLVAAAYTVLALRYTRTAE-E--LYFST	46
<i>S. cerevisiae</i> GMT	MSELKTHAGHNPWASVANS GPISILSYCGSSILMTVTNKFPVNLKDFNMNFVLMFVQS-----LVCTI	64
<i>L. donovani</i> GMT	MNHTRS-----VMEAVLAVTYSFCSVSMILVNKLIMNTYDMNFPFGILVLVQT-----GGALV	53
Humaner UGT1	AVVMAEVLKGLTCLLLFAQKRGVVKH--LVLPLHEAVLVQYVDTLKLA VPSLIYTLQNNLQYVAISNLP	138
Humaner UGT2	AVVMAEVLKGLTCLLLFAQKRGVVKH--LVLPLHEAVLVQYVDTLKLA VPSLIYTLQNNLQYVAISNLP	138
Maus UGT	AVVMAEVLKGLTCLLLFAQKRGVVKH--LVLPLHEAVLVQYVDTLKLA VPSLIYTLQNNLQYVAISNLP	138
<i>S. pombe</i> UGT	AVLLNLELKLKLVCFVGVYHFRKNVKGKBAKLRAPLPQ-IFGG--DSWKLAIAPFLYTCNNLQYVAISNLP	121
Humaner UGlcNAcT	AVVVAELKIMACILLVYKDSKCSLRA--LNRVLDHDEILNKPMETLKLAI PSLYTLQNNLQYVAISNLP	110
Hunde UGlcNAcT	AVVVAELKIMACILLVYKDSKCSLRA--LNRVLDHDEILNKPMETLKLAI PSLYTLQNNLQYVAISNLP	110
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	LIQLPNALDFSH-FPFRLRPRHIPLK-----IHMLAVLFFFTSSVANNVSVKFDISV	96
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	COGLPEFLDVHQPFPY-FKPLKTPH-----YVITVVLVYISSTNNVFKNLSI	97
Humaner CST	AVCITEVILKLLSVGILAKET-GSLGR--FKASLRENVLGSPEKELKLSVPSLVYAVQNNMAFLALSNLDA	114
Hamster CST	AVCVTEVILKLLSVGLLAKET-GSLGR--FKASLRENVLGSPEKELKLSVPSLVYAVQNNMAFLALSNLDA	114
Maus CST	AVCITEVILKLLSVGILAKET-GSLGR--FKASLRENVLGSPEKELKLSVPSLVYAVQNNMAFLALSNLDA	114
<i>S. cerevisiae</i> GMT	TLIILRLGYAKFRSLNKTDAKNWFP-----ISFLVLMVITSSKALQY-----LAV	111
<i>L. donovani</i> GMT	IVALAKAARFIEYPAPSFVDAKKWLP-----LTLFLVAMLFTSMKSLGT-----MSV	100
Humaner UGT1	ATFQVTYQLKILTTALFSLVLMNRSLSRLQWASLLLLFTGVAIVQ-AQQAG-----GGGPRPLDQNP	201
Humaner UGT2	ATFQVTYQLKILTTALFSLVLMNRSLSRLQWASLLLLFTGVAIVQ-AQQAG-----GGGPRPLDQNP	201
Maus UGT	ATFQVTYQLKILTTALFSLVLMNRSLSRLQWASLLLLFTGVAIVQ-AQQAG-----GGGPRPLDQNP	201
<i>S. pombe</i> UGT	ASFQVTYQLKILTTALFSLVLMNRRSGPMKWFSLFLTGSAIVQLQNLNS-----D-DQMSAGMPNP	185
Humaner UGlcNAcT	ATYQVTYQLKILTTALFSLVLMNRSLSRLQWASLLLLFTGVAIVQ-AQQAG-----GGGPRPLDQNP	174
Hunde UGlcNAcT	ATYQVTYQLKILTTALFSLVLMNRSLSRLQWASLLLLFTGVAIVQ-AQQAG-----GGGPRPLDQNP	174
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	PIHIIFRCSGTTMIIGWAVCNKRYSKLQVQSAIIMTLAIIVASLYRDKFMSDSLKNTDSVGMTQKS-	166
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	PIHIIFRCSGTTMIIGWAVCNKRYSKLQVQSAIIMTLAIIVASLYRDKFMSDSLKNTDSVGMTQKS-	166
Humaner CST	AVYQVTYQLKIPCTALCTVLMNRTLSKQLQWVSVFMLCGVTLVQWKPQA-----TKVVVEQNPL	176
Hamster CST	AVYQVTYQLKIPCTALCTVLMNRTLSKQLQWVSVFMLCGVTLVQWKPQA-----TKVVVEQNPL	176
Maus CST	AVYQVTYQLKIPCTALCTVLMNRTLSKQLQWVSVFMLCGVTLVQWKPQA-----TKVVVEQNPL	176
<i>S. cerevisiae</i> GMT	PIYTTFNKLTILLLAYGELFFGGSVSMELSSFLMLVLSVVATWGDQVAAKAASLAEGAAGAVASFNP	183
<i>L. donovani</i> GMT	AAQTILKNLAVVLLIALSDKFLYGAQTPMVFYSFALMILSLLGAKGDKWVTAW-----MSV	154
Humaner UGT1	GLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	268
Humaner UGT2	GLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	268
Maus UGT	GLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	268
<i>S. pombe</i> UGT	GFSAVLVAACLISGAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	252
Humaner UGlcNAcT	GLMAVLTACFSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	241
Hunde UGlcNAcT	GLMAVLTACFSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	241
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	--MFGIFVVLVATALMSLSSLNNEWYTKCGKHKKEFLYSHFLALPLFMLGYTRLRDEFRDLLISSDSMDI	236
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	TFIFGICILVLSSTSSLLSAYNERTYQYKGGKWKENIYFYSHFSLPLFLFSLRKLQIHEYRVMRKSERLCS	241
Humaner CST	GFGAIAIAVLCSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	243
Hamster CST	GFGAIAIAVLCSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	243
Maus CST	GFGAIAIAVLCSSGFAGVYFEKILKGGSSGV--WLRNL--QLGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFF	243
<i>S. cerevisiae</i> GMT	GYFWMFTNCITSAFLVLMRKRILKTT--FKDF--DTMFYNNVLLALPILLLFSFCVED-----W	244
<i>L. donovani</i> GMT	GLVWTFNLINIVSTVSYTLVMAVLLGSSVNSIGRY--GPVFNLLSLPFLIMG--VGD--IMP	219
Humaner UGT1	PAVWGVVNLQAFGLLVAVVVKY---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	328
Humaner UGT2	PAVWGVVNLQAFGLLVAVVVKY---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	328
Maus UGT	PAVWGVVNLQAFGLLVAVVVKY---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	328
<i>S. pombe</i> UGT	SIVWLAAILLQAGGGIIVALCVAF---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	312
Humaner UGlcNAcT	RLTWIIVVVLQALGGLVIAAVIKY---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	302
Hunde UGlcNAcT	RLTWIIVVVLQALGGLVIAAVIKY---ADNLIKGFATSLSLVSTVAS-----IRLFGFHVDP	302
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	PIV-KLPFIATKFLMLIANNVQFICIKGVNMLASNTDALTVSVLLVRKVFVLSLVSVIYKNVLSVTAY	307
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	NFGGKILVPREETLLFLNVLTVYFCVKGVNILASNTNALTSLITLLVRKVFVLSLVSRIYKNVLSVTAY	313
Humaner CST	YVWFVIFLASVGLYTSVVVKY---TDNIMKGFSAATAVLSSTIAS-----VMLFGLQITL	303
Hamster CST	YVWFVIFLASVGLYTSVVVKY---TDNIMKGFSAATAVLSSTIAS-----VMLFGLQITL	303
Maus CST	YVWFVIFLASVGLYTSVVVKY---TDNIMKGFSAATAVLSSTIAS-----VMLFGLQITL	303
<i>S. cerevisiae</i> GMT	NNFSDSLTAMIISGVASVGISVCSGCVSRV---TSSTTYSMVGALNKLPIALSGLIFFDAPRNF	312
<i>L. donovani</i> GMT	TTFGKLVLT--FSLVSSVMTFSVFCMST---TSPTTMSVVGSLNKLPIALFGLMGLVHQFPTAT	284
Humaner UGT1	GLVIGAVYLYSLPRGAAKAIASASASASGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRGDLITEPFLPKSVLTK	393
Humaner UGT2	GLVIGAVYLYSLPRGAAKAIASASASASGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRGDLITEPFLPKSVLTK	396
Maus UGT	GLVIGAVYLYSLPRGAAKAIASASAS--GPCIHOQPPGQPPPPQLSS--RGDLTTEPFLPKSVLTK	390
<i>S. pombe</i> UGT	MLVIAATFLYTKP-----ESKPSPSRGTYIPMTDAAAKDVEDHKKH	353
Humaner UGlcNAcT	ILVITATFLYGY-----DPKPAGNPTKA	325
Hunde UGlcNAcT	ILVITATFLYGY-----DPKPAGNPTKA	326
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	ITVFLGAGLYSYGSV-----KATL-----PR	328
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	YLVFPGAFIYSLGSIHP-----RQNDKGAIK-----KSK	342
Humaner CST	LLVCVSIYLYGLPRQDTTISIQGETASKE-----RVIGV	337
Hamster CST	LLVCVSIYLYGLPRQDTTISIQGETASKE-----RVIGV	336
Maus CST	LLVCVSIYLYGLPRQDTTISIQGETASKE-----RVIGV	336
<i>S. cerevisiae</i> GMT	FIGFLSGIIVAV-----AKQKKQAQ---PLRK	337
<i>L. donovani</i> GMT	MIALSAGFLYTHLNIIRANRAKASSDTEH---QMQQAGKTTAESIVLVRADENSND-----TSKSE	341

Abbildung 2: Primärsequenzvergleich aller bisher beschriebenen Zucker-Nukleotid Transporter. Aminosäuren, die in mindestens neun der dreizehn Transporter konserviert sind, sind schwarz unterlegt. UGT: UDP-Galactose Transporter, UGlcNAcT: UDP-N-Acetylglucosamin Transporter, CST: CMP-Sialinsäure Transporter, GMT: GDP-Mannose Transporter

In parallelen Ansätzen wurden weitere Transporter durch proteinchemische Aufreinigungen isoliert, die aber noch nicht in ihrer Sequenz bekannt sind (Puglielli *et al.*, 1999; Puglielli und Hirschberg, 1999). In Datenbankrecherchen wurden darüber hinaus eine Vielzahl weiterer potentieller Zucker-Nukleotid Transportersequenzen identifiziert (Gerardy-Schahn und Eckhardt, 2000; Berninsone und Hirschberg, 2000).

Fast alle bisher isolierten Zucker-Nukleotid Transporter sind substratspezifisch. Eine Ausnahme ist ein potentieller Zucker-Nukleotid Transporter aus *C. elegans* (SQV-7), der *in vitro* sowohl UDP-Glucuronsäure, UDP-N-Acetylglucosamin und UDP-Galactose transportiert (Berninsone und Hirschberg, 2000). Eine weitere Ausnahme ist der Transporter LPG2 aus *Leishmania donovani*, der neben GDP-Mannose auch GDP-Arabinose und GDP-Fucose transportiert (Hong *et al.*, 2000).

Eine weitere Methode, um die Aktivität der Zucker-Nukleotid Transporter zu bestätigen, ist die heterologe Expression der Transporter in anderen Spezies. Vor diesem „Null-Hintergrund“ (wenn der entsprechende Zucker-Nukleotid Transporter in dieser Spezies nicht vorkommt) kann sowohl die Aktivität bestimmt werden als auch ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Transportern nur um Faktoren handelt, die am Transport beteiligt sind. Der humane UGT und der Maus CST wurde in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. Beide zeigten dieselben Transporteigenschaften wie nach Expression in Säugetierzellen (Sun-Wada *et al.*, 1998; Berninsone *et al.*, 1997). Demnach handelt es sich bei den isolierten Transporter um die funktionell aktiven Einheiten, die keine weiteren Faktoren für ihre Aktivität benötigen.

3.6.3. Struktur-Funktions-Beziehungen der Zucker-Nukleotid Transporter

Die Lokalisation der Zucker-Nukleotid Transporter wurde für den Maus und Hamster CST, den humanen (Isoform 1) und Maus UGT und den *S. cerevisiae* GDP-Mannose Transporter in Immunfluoreszenzstudien ermittelt und stimmt mit den in den biochemischen Studien gefundenen Lokalisationen überein (Eckhardt *et al.*, 1996; Eckhardt und Gerardy-Schahn, 1997; Yoshioka *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1999a; Gao und Dean, 2000). Mit Ausnahme eines Dilysinmotivs des im ER lokalisierten UDP-N-Acetylglucosamin Transporters aus *S. cerevisiae* (Roy *et al.*, 2000) existieren keine offensichtlichen Sequenzmotive, die für die Rückhaltung bzw.

Lokalisation der bisher bekannten Transporter im Golgi-Apparat verantwortlich sein könnten. Die Tatsache, dass Säugetiertransporter in Hefe exprimiert werden können (siehe 3.6.2.) und dort ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert sind, legt nahe, dass dennoch ein konserviertes Signal oder Strukturmotiv für die Lokalisation der Zucker-Nukleotid Transporter existiert.

Alle Mitglieder der Familie der Zucker-Nukleotid Transporter sind stark hydrophobe Typ III Membranproteine. In Strukturvorhersagen werden sechs bis zehn Transmembrandomänen (TMD) vorgeschlagen. In allen bisher durchgeführten Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert sind (Eckhardt *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 1999a; Aoki *et al.*, 1999; Gao und Dean, 2000). Dies spricht für eine gerade Anzahl an TMD.

Die Topologie des Maus CST wurde experimentell bestimmt (Eckhardt *et al.*, 1999). In computergestützten Topologievorhersagen wurden sechs bis neun TMD vorgeschlagen (Eckhardt *et al.*, 1996). Für den sehr homologen Hamster CST wurden acht TMD vorgeschlagen (Eckhardt und Gerardy-Schahn, 1997). Durch die Insertion von Hemagglutinin (HA)-Epitopen in potentielle „Loops“ des Transporters und nach selektiver Permeabilisierung der Membranen konnten die Lokalisation der Epitope im Verhältnis zur Membran des Golgi-Apparats bestimmt werden. Es wurden zehn TMD gefunden. Sequenzvergleiche mit anderen bekannten Zucker-Nukleotid Transportern legen nahe, dass alle bisher bekannten Zucker-Nukleotid Transporter zehn TMD besitzen.

Die transportaktive Einheit von Zucker-Nukleotid Transportern ist nicht geklärt. Einige Zucker-Nukleotid Transporter (z.B. Säugetier CST und UGT), haben ein „Leucine-Zipper“-Motiv, das bei vielen Proteinen an der Ausbildung von Oligomeren beteiligt ist. Das Motiv ist aber für die Aktivität der Transporter nicht notwendig (Eckhardt *et al.*, 1999). Bei der Aufreinigung verschiedener Zucker-Nukleotid Transporter ergaben sich Hinweise, nach denen die Transporter als Homodimere vorliegen (Puglielli *et al.*, 1999; Puglielli und Hirschberg, 1999; Gao und Dean, 2000). In einer weiteren Arbeit wurde für den GDP-Mannose Transporter aus *L. donovani* ein Homohexamer als funktionelle Einheit beschrieben (Hong *et al.*, 2000).

Für den GDP-Mannose Transporter aus *S. cerevisiae* wurde darüber hinaus gefunden, dass der C-Terminus für die Ausbildung des Homodimers und für die

Stabilität des Proteins verantwortlich ist (Gao und Dean, 2000; Abe *et al.*, 1999). Der N-Terminus andererseits soll für den Export des Transporters aus dem ER verantwortlich sein (Gao und Dean, 2000). Im Gegensatz dazu war beim Maus UGT die Entfernung des N- und C-Terminus (29 N-terminale Aminosäuren, 39 C-terminale Aminosäuren) möglich, ohne die Aktivität des Transporters oder die subzelluläre Lokalisation zu beeinflussen (Ishida *et al.*, 1999a). Auch bei einem Austausch des N- und C-Terminus zwischen dem humanen UGT Isoform 1 und dem CST wurde die Aktivität der Transporter nicht beeinträchtigt. Die Herstellung chimärer Transporter durch Austausch ganzer TMD zwischen dem UGT und CST führte mit einer Ausnahme zu inaktiven Proteinen. Die Ausnahme ist eine Chimäre, in welcher die C-terminale TMD UGT durch die entsprechende TMD des CST ausgetauscht wurde. Der Transporter zeigte weiterhin UGT Aktivität (Aoki *et al.*, 1999).

Zur Darstellung von Struktur-Funktions-Beziehungen in Zucker-Nukleotid Transportern wurden Klone zweier Komplementationsgruppen auf ihre genetischen Defekte untersucht. In der ersten Studie wurden die molekularen Ursachen für die Defekte unabhängiger Klone der CHO Komplementationsgruppe Lec2 analysiert. Lec2-Zellen sind für den Transport von CMP-Sialinsäuren defekt. Neben verschiedenen Deletionen und Insertionen wurde eine Punktmutation G189E gefunden, die den CST inaktiviert (Eckhardt *et al.*, 1999). In einer zweiten Studie wurden die molekularen Ursachen für die Defekte unabhängiger Klone von Maus Had-1-Zellen untersucht. Had-1 haben wie CHO Lec8-Zellen einen Defekt im UGT. Auch hier wurden in der Mehrzahl der Klone Deletionen und Insertionen und nur in einem Falle eine Punktmutation G178D gefunden, die für die Inaktivierung des UGT verantwortlich war (Ishida *et al.*, 1999a).

3.6.4. UDP-Galactose Transporter

1996 wurde der humane UGT von Miura und Mitarbeitern (Miura *et al.*, 1996) kloniert. Grundlage für die Isolierung des Transporters waren Had-1-Zellen. Dabei handelte es sich um eine FM3A-Mauszelllinie, für die ursprünglich ein Defekt im Newcastle Disease Virus Rezeptor gefunden wurde (Hara *et al.*, 1989a). Später fand man zusätzlich einen Defekt im UDP-Galactose Transport (Hara *et al.*, 1989b). Der UGT wurde durch Komplementationsklonierung mit einer humanen genomischen DNA-Bank in Had-1-Zellen isoliert (Miura *et al.*, 1996). Wenig später wurde von derselben Gruppe die Isolierung einer zweiten Isoform beschrieben

(Ishida *et al.*, 1996). Beide Isoformen unterscheiden sich nur in den letzten sechs Aminosäuren und sind vermutlich durch eine alternative Prozessierung („Splicing“) der mRNA entstanden. Die funktionelle Aktivität des humanen UGT wurde durch Transportuntersuchungen in der defizienten Had-1-Zelllinie und durch heterogene Expression in der Hefe *S. cerevisiae* nachgewiesen. Von einer anderen Gruppe wurde durch Komplementation eines vanadiumsensitiven Klons *gms1-1* aus *Schizosaccharomyces pombe* (Takegawa *et al.*, 1996) der vermeintliche UGT aus der Hefe isoliert (Tabuchi *et al.*, 1997). In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass bei diesem Gen die erste TMD fehlte (Segawa *et al.*, 1999). Wenige Jahre später wurde der UGT aus der Maus kloniert (Ishida *et al.*, 1999a). Die Sequenz hat sehr große Ähnlichkeit mit den humanen Transportern (95% Identität). Der C-Terminus des UGT aus der Maus ist mit dem der Isoform 1 des humanen Transporters identisch. Es gibt keinen Hinweis auf die Existenz einer zweiten Isoform in der Maus (Ishida *et al.*, 1999a).

Für den humanen und den Maus UGT wurde gezeigt, dass sie im Golgi-Apparat lokalisiert sind (Yoshioka *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1999a). Offen bleibt, wie für die kürzlich untersuchte UDP-Galactose:Ceramid Galactosyltransferase (CGalT; Sprong *et al.*, 1998), die im ER lokalisiert ist, das Substrat UDP-Galactose im ER bereitgestellt wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gene für den humanen und Maus UGT auf dem X Chromosom lokalisiert sind (human: Bande Xp11.22-p11.23 Hara *et al.*, 1993; Maus: Region A2, Ishida *et al.*, 1999a)

Mit dem Maus UGT wurden verschiedene Studien zur Struktur-Funktions-Beziehung durchgeführt. In einer Arbeit wurde entweder der N- oder der C-Terminus (29 N-terminale Aminosäuren, 39 C-terminale Aminosäuren) entfernt, ohne dass die Aktivität oder subzelluläre Lokalisation im Golgi-Apparat verloren ging (Ishida *et al.*, 1999a). In der gleichen Arbeit wurden die genetischen Defekte von verschiedenen Had-1-Klonen untersucht und dabei eine Punktmutation G178D gefunden, die den UGT inaktiviert (Ishida *et al.*, 1999a).

In einer weiteren Studie wurden Chimäre zwischen dem humanen UGT Isoform 1 und dem CST hergestellt und analysiert (Aoki *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass N- und C-Terminus austauschbar waren, ohne dass die Aktivität der Transporter beeinträchtigt wurde. Wenn Transmembrandomänen ausgetauscht wurden, waren die Transporter in fast allen Fällen inaktiv. Nur bei einem Austausch der letzten TMD des UGT durch die des CST war der UGT weiterhin aktiv (Aoki *et al.*, 1999).

3.7. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung des Hamster UGT und die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen für diesen Transporter. Wegen des bereits bekannten humanen UGT konnte für die Isolierung des Hamster UGT ein Homologieansatz gewählt werden. Die Identifizierung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen sollte mit Hilfe unabhängiger Klone der CHO Komplementationsgruppe Lec8 durchgeführt werden. Lec8-Zellen besitzen einen Defekt im UDP-Galactose Transportsystem. Auf der Basis der identifizierten Sequenz des Wildtyp UGT konnten die molekularen Ursachen, die zu den Defekten führten, bestimmt werden. Gefundene Mutationen sollten auf ihre Bedeutung für die Aktivität und subzelluläre Lokalisation des Hamster UGT und anderer, verwandter Zucker-Nukleotid Transporter untersucht werden.

In weiteren Studien zu Darstellung von Struktur-Funktions-Beziehungen sollte die Membrantopologie des Hamster UGT untersucht werden. Die computergestützte Vorhersage von zehn Transmembrandomänen sollte experimentell bestätigt werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Zelllinien

CHO K1 (C6)	Hamster-Ovarien-Zelllinie, ATCC CCL 61, Subklon C6 (Dr. M. Eckhardt)
COS-7	Affennieren-Zelllinie (CV-1-Fibroblasten), stabil transformiert mit einer replikationsdefekten SV40-DNA, ATCC CRL 1651
6B2	Subklon aus der Komplementationsgruppe Lec2 (CHO K1-Zellen mit einem Defekt im CMP-Sialinsäure-Transportsystem; Eckhardt <i>et al.</i> , 1998)
Lec8	Subklon aus der Komplementationsgruppe Lec8 (CHO K1-Zellen mit einem Defekt im UDP-Galactose-Transportsystem); ATCC CRL 1737

Weitere verwendete Klone der Komplementationsgruppe Lec8 (Lec8.5H, Lec8.1C, Lec8.2B, LEC10.Lec8, Lec3.2.8, Lec3.2.8.1, Lec4.8.7A, Lec4A.Lec8) wurden von Prof. P. Stanley zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 2).

4.1.2. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZY-A-argF)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
-----------------------------	---

4.1.3. Vektoren

pABE	Derivat des Vektors pCDM8, enthält an Stelle des SupF-Fragments ein Ampicillin-Resistenzgen (A. Bethe)
pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor und prokaryontischer Expressionsvektor (Stratagene)
pcDNA3	Eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pEVRF0-HA	Eukaryontischer Expressionsvektor (Matthias <i>et al.</i> , 1989)
pGEM-T	Klonierungsvektor mit Adenin-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten (Promega)

4.1.4. Antikörper

4.1.4.1. Primärantikörper

735	anti-PSA-monoklonaler Antikörper (mAk) (Maus; Subklasse IgG _{2a}), erkennt α -2,8-verknüpfte Neu5Ac ab einer Kettenlänge von acht Resten (Frosch <i>et al.</i> , 1985; Finne <i>et al.</i> , 1987)
12CA5	anti-HA-mAk (Maus; Subklasse IgG _{2b}), erkennt das HA-Epitop YPYDVPDYASL (Roche)
M5	anti-FLAG-mAk (Maus; Subklasse IgG ₁), erkennt das FLAG-Epitop MDYKDDDDK (Sigma)
Anti- α -Mannosidase II	polyklonales Kaninchenserum, von K. Moreman (University of Georgia, Athens, GA) zur Verfügung gestellt

4.1.4.2. Sekundärantikörper

Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche
Anti-Maus-Ig Alkalische Phosphatase-Konjugat	Jackson ImmunoResearch, Dianova
Anti-Maus IgG Cy3-Konjugat	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG Alexa448-Konjugat	Molecular Probes, MoBiTec

4.1.5. Enzyme

Alkalische Phosphatase (1U/ μ l)	Amersham Pharmacia Biotech
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsendonukleasen (<i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Bst</i> XI, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sac</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I; 10-20 U/ μ l)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase (1U/ μ l)	New England Biolabs
RNase freie DNase I	Promega
RNase H	Gibco BRL
Superscript II, RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Gibco BRL
T3-RNA Polymerase (10 U/ μ l)	Roche
T7-RNA Polymerase (10 U/ μ l)	Roche
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma

Die Endoneuraminidase NE (Endo NE, (Finne und Makela, 1985; Gerardy-Schahn *et al.*, 1995)) wurde als (His)₆-Fusionsprotein selbst aufgereinigt.

4.1.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen und sind in 5'-3'-Orientierung aufgeführt. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotide abgeleitet von Vektorsequenzen:

T7	AATACGACTCACTATAGG
SP6	GCATTTAGGTGACACTATAGAATAG
TVrevers	TAGGTGACACTATAGAATAC
329 (T3)	ACCATGATTACGCCAAGC

Oligonukleotide für die 5'-RACE (4.2.3.25):

ME44	GCGGATCCTCGAGTCCACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ME45	GCGGATCCTCGAGTCGAC

Oligonukleotide zur Generierung eines HA-Adapters mit *Bam*HI und *Nhe*I-Schnittstellen:

HA sense	GATCCTACCCTTATGACGTCCCCGATTACGCCAGCCTGG
HA anti	CTAGCCAGGCTGGCGTAATCGGGGACGTCATAAGGGTAG

Oligonukleotide zur Sequenzierung des humanen UDP-Galactose Transporters (Isoform 1):

UGT1	AGCTGGTATGTCACCTG
UGT2	GGCTTCGCAGGTGTCTA
UGT3	CCCAGTTGCAGGTTGCG
UGT4	GCTGTGGTTGTCAAGTA
SO004	GTGGAACCACCAGCC
SO133	GCTCTCACTTGACCAGCAC

Oligonukleotide zur Sequenzierung des Hamster UDP-Galactose Transporters:

SO003	GATATGCTCGTACACTG
SO005	CTGTTCTCCGTGCTCATG
SO006	GATGGCAACATACTGGAGG
SO007	CACCGCGAGCTTGAGTGTGTC
SO008	GTTGTAGTCAAGTACGC
SO009	CGGAGCCCTTTCTGCC
SO010	CAGGGGTATACTTGAG
SO011	GGCAGGCCAGTGTCTTC
SO012	GAAGGGTTCGTAGCTGC
SO013	GTAGAGGTAGACGGCAC
SO014	GTGTCTGTGCCAAAGAG
SO015	CGGTTCAACATGAGCAC
SO016	GGAGACAGGTGACACC
SO017	GTGAGCCTGTAGCGGAC
SO020	GTATCCGCTGGCGCGCTG
SO021	CAGCGCGCCAGCGGATAC

SO022 GGCAGATCCGCCAACC
 SO045 GAAGTAGCCTGCTGTTGCC
 SO046 GTTTAGTCCCAGCTGGGCC
 SO047 CACCCTACCCCTAATACTG
 SO048 GACGGAACGGGCAGATGC
 SO049 GTGTCACCTGTCTCCTG
 SO134 CATTTTATTTGCAGAACTTACC
 SO135 GACAGTCGGTCGGTG

Oligonukleotide zur Sequenzierung des Maus CMP-Sialinsäure Transporters:

ME32 CCTGACAGATACATCTG
 ME65 AACGTCTTGGGGAGCC
 ME66 TATTGCTGTATTGTGCT

Oligonukleotide zur Einführung von Schnittstellen an den Enden des humanen UDP-Galactose Transporters (Isoform 1):

SO001 GCGGATCCGCAGCGGTTGGGGCTGGTGG 5'-EcoRI
 SO002 GCGGATCCCTTACCAGCACTGACTTTGG 3'-XbaI

Oligonukleotide zur Einführung von Schnittstellen an den Enden des Hamster UDP-Galactose Transporters:

SO018 GCGGATCCGCAGCGGTTGGGGTTGGCGG 5'-BamHI
 SO019 GCGGATCCCGAACCCTTACCTTGGTGAGC 3'-BamHI
 SO023 GCGAATTCGCAGCGGTTGGGGTTG 5'-EcoRI
 SO024 CGTCTAGACTACGAACCCTTAC 3'-XbaI (Stop)

Oligonukleotide zur Einführung von Schnittstellen an den Enden des Maus CMP-Sialinsäure Transporters:

ME41 GCGGATCCATGGCTCCGGCGAGAG 5'-BamHI
 ME42 GCGGATCCCCACACCAATGATTCTCTCTTTT 3'-BamHI
 ME71 GCGAATTCGCTCAGGCGAGAGAA 5'-EcoRI
 ME72 GCTCTAGATCACACACCAATGAC 3'-XbaI (Stop)

Oligonukleotide zur Einführung von Schnittstellen an den Enden des *A. thaliana* UDP-Galactose Transporters 1:

SO067 GCGGATCCGAGGAAGGAAGTATGTTTCAG 5'-BamHI
 SO068 GCGGATCCGACTTTGCCTTCGAGTTTATC 3'-BamHI
 SO070 CGTCTAGATCAGACTTTGCCTTCGAG 3'-XbaI (Stop)

Oligonukleotide zur Einführung von Schnittstellen an den Enden des *A. thaliana* UDP-Galactose Transporters 2:

SO129 GCGAATTCGAGAAACCGGAGAGCGAGAAG 5'-EcoRI
 SO130 GCTCTAGATTATGGTTTGTGTCACCG 3'-XbaI (Stop)
 SO131 GCTCTAGATTGGTTTGTGTCACCGAGTTC 3'-XbaI

Oligonukleotide zur Generierung von N-Konstrukten (5.13.2 und Abbildung 24) im Hamster UDP-Galactose Transporter; Einführung von *Bam*HI- und *Nhe*I-Schnittstellen:

SO025	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> AGCTAAGGATATGTA CTTG	N1
SO026	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> GTGCTGGTGGTCCAG	N1
SO027	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GAGAACCAGGTGCTTC	N16
SO028	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> TTCTCCACGAGGCTG	N16
SO029	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GATGGCAACATACTGG	N14
SO030	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> TCCAACATGCCAGCTG	N14
SO031	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GCGGTTCAACATGAG	N13
SO032	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> AGCCTCTCACGCCTG	N13
SO033	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> ACCCCCACCAGCTTG	N4
SO034	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> GGCCCACGGCCAC	N4
SO035	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GCTGCCTTTGAGGATC	N5
SO036	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> TCAGGTTCTGTGTGGC	N5
SO037	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> CACAGCAGTGCCTTC	N6
SO038	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> GCCCGTCGAGGCTTC	N6
SO041	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> AGCTGGCAGGTTGGAG	N14a
SO042	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> GCCACTTTCCAGGTG	N14a
SO043	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GATGTTGTCAGCGTAC	N7a
SO044	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> CTCAAGGGCTTTGCC	N7a
SO057	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> ACCCTCTTCTGGGC	N17
SO058	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> AATGTGAAGCACCTG	N17
SO059	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GAGCTTGAGTGTGTC	N18
SO060	<u>GGATCCAACGCTGAC</u> GCGGTGCCCTCTCTC	N18
SO063	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> CAGGGCAAATAATGG	N20
SO064	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> GGCGCTGGGCTCGTC	N20
SO065	<u>GCTAGCGTTGGATCC</u> GGCAGAGGCAGAAGT	N21
SO066	<u>GGATCCAACGCTAGC</u> TCTGCCTCTGCCTCT	N21

Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen in den Hamster UDP-Galactose Transporter:

SO050	CTCTTCACTGATGTGGCG	G178D
SO051	CAATCGCCACATCAGTGAAG	G178D
SO052	CTCTCCTCAGAATTTGCAGG	G214E
SO053	CCCCTGCAAATTCTGAGGAG	G214E
SO085	GGTTATTCTGCAAAGTATGGATGAGAGAGG	Y122H
SO086	CCTCTCTCATCCATACTTTGCAGAATAACC	Y122H
SO087	GGTTATTCTGCAAAGTAAAGATGAGAGAGG	Y122F
SO088	CCTCTCTCATCTTTACTTTGCAGAATAACC	Y122F
SO089	GGTTATTCTGCAAAGTCCAGATGAGAGAGG	Y122W
SO090	CCTCTCTCATCTGGACTTTGCAGAATAACC	Y122W
SO091	GGTTATTCTGCAAAGTTTCGATGAGAGAGG	Y122E
SO092	CCTCTCTCATCGAACTTTGCAGAATAACC	Y122E
SO093	GGTTATTCTGCAAAGTAGCGATGAGAGAGG	Y122A
SO094	CCTCTCTCATCGCTACTTTGCAGAATAACC	Y122A
SO095	GGTTATTCTGCAAAGTAATGATGAGAGAGG	Y122I
SO096	CCTCTCTCATCATTACTTTGCAGAATAACC	Y122I
SO097	CCTGCAAAGCCTGAGAGACAGGAGG	ΔS213

SO098	CCTCCTGTCTCTCAGGCTTTGCAGG	ΔS213
SO099	CCTGCAAAGCCTGTGGAGAGACAGGAGG	S213T
SO100	CCTCCTGTCTCTCCACAGGCTTTGCAGG	S213T
SO101	CCTGCAAAGCCATCGGAGAGACAGGAGG	S213D
SO102	CCTCCTGTCTCTCCGATGGCTTTGCAGG	S213D
SO103	CCTGCAAAGCCTGCGGAGAGACAGGAGG	S213A
SO104	CCTCCTGTCTCTCCGCAGGCTTTGCAGG	S213A
SO105	CCACCAGTAGCCCATCAAAGGCTTGG	G281D
SO106	CCAAGCCTTTGATGGGCTACTGGTGG	G281D
SO107	CCACCAGTAGCCCAGCAAAGGCTTGG	G281A
SO108	CCAAGCCTTTGCTGGGCTACTGGTGG	G281A
SO109	CCACCAGTAGCCCAGAAAAGGCTTGG	G281S
SO110	CCAAGCCTTTTCTGGGCTACTGGTGG	G281S
SO137b	CCTCCTGTCTCTCCGCATCAGGCTTTGCAGG	SAS212/13
SO138	CCTGCAAAGCCTGATGCGGAGAGACAGGAGG	SAS212/13
SO139	CCTCCTGTCTCGCCGCAGGCTTTGCAGG	SS212/13AA
SO140	CCTGCAAAGCCTGCGGCGAGACAGGAGG	SS212/13AA
SO143	CTCCTGTCTCTGCGCAGGCTTTGCAG	SS212/13CA
SO144	CTGCAAAGCCTGCGCAGAGACAGGAG	SS212/13CA
SO141	GCTTTGCCACCTTCCTGTCTATTG	S302F
SO142	CAATAGACAGGAAGGTGGCAAAGC	S302F

Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen in den Maus CMP-Sialinsäure Transporter:

SO054	GTGTGGTGATGTCACACTC	G154D
SO055	GTGTGACATCACCACACAG	G154D
SO114	GTTCTGCACAGCATGCACTAGTGATG	Y98H
SO115	CATCACTAGTGCATGCTGTGCAGAAC	Y98H
SO116	CTCCTGCAAATCCACACAATACAGCAATAGC	ΔS188
SO117	GCTATTGCTGTATTGTGTGGATTTGCAGGAG	ΔS188
SO118	GACGTGTAGAGGCCATCCACACTAGCAAGG	G256D
SO119	CCTTGCTAGTGTGGATGGCCTCTACACGTC	G256D
SO136	CTCCTGCAAATCCAGGCCACAATACAGCAATAG	CS187/88WP
SO137a	GCTATTGCTGTATGTGGCCTGGATTTGCAGGAG	CS187/88WP
SO145	GCTATTGCTGTATTGTCCGCTGGATTTGCAGGAG	S188A
SO146	CTCCTGCAAATCCAGCGGACAATACAGCAATAGC	S188A

Oligonukleotide zur Generierung von Verkürzungen des Hamster UDP-Galactose Transporters; Einführung von *EcoRI*-, *BamHI*- oder *XbaI*-Schnittstellen:

SO077	<u>GCGAATTC</u> GTTGGCGGATCTGCCGC	Δ1-5
SO078	<u>GCGAATTC</u> GGGCCAGGGGCCGTATC	Δ1-13
SO079	<u>GCGAATTC</u> GCGCTGGAGCCTGGGTC	Δ1-21
SO080	<u>GCGAATTC</u> CGCCTCAAGTACATATC	Δ1-33
SO120	<u>GCGGATCC</u> CGCCTCAAGTACATATC	Δ1-33
SO111	<u>GCGAATTC</u> ATATCCTTAGCTGTGCTG	Δ1-37
SO081	<u>GCGAATTC</u> GTGCTGGTGGTCCAGAA	Δ1-41
SO132	<u>CGTCTAGACT</u> ACTTGGTGAGCAACTTTGGC	Δ395-398
SO082	<u>CGGGATCC</u> AGTTATGGCTTTGACTG	Δ350-398

SO083	CGGGATCCGACTGCACTTCGGGGAA	Δ346-398
SO084	CGGGATCCGGGAAGGCTGTAGAGGT	Δ342-398
SO121	CGTCTAGAGGGAAGGCTGTAGAGGT	Δ342-398
SO122	CGTCTAGATCAGGGAAGGCTGTAGAGGT	Δ342-398 (Stop)
SO112	CGGGATCCGTAGACGGCACCAATGAC	Δ337-398
SO123	CGTCTAGAGTAGACGGCACCAATGAC	Δ337-398
SO124	CGTCTAGACTAGACGGCACCAATGAC	Δ337-398 (Stop)
SO113	CGGGATCCACCAATGACGAGCCCAGC	Δ334-398

4.1.7. Chemikalien

α -[³⁵ S]-dATP (400 Mbq/ml)	Amersham Pharmacia Biotech
β -Mercaptoethanol	Merck
Aceton	Riedel de Haën
Acrylamid 40% (37,5:1)	Applichem
Acrylamid 40% (29:1)	Roth
Acrylamid 40% (19:1)	GibcoBRL
Agarose	GibcoBRL
Ampicillin (Binotal)	Bayer
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Blockierungsreagenz	Roche
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Fluka/Roth
Rinderserumalbumin (BSA; Fraktion V)	Applichem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
di-Natrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo-[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat (CSPD)	Roche
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma
Dimethylpimelimidat	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs (je 100 mM ATP, CTP, GTP, TTP in H ₂ O)	Amersham Pharmacia Biotech
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Ethanolamin	Aldrich
Ethidiumbromid (EtBr)	Roche
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Merck
Glutardialdehyd (25%ige Lösung in Wasser)	Merck
Glycerol (wasserfrei)	Merck
Glycin	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haën
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Levamisol	Sigma
Lipofectamine	GibcoBRL
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol	Baker

Moviol	Calbiochem
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumborat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel de Haën
Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Fluka
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche
Paraformaldehyd (PFA)	Baker
Phenol/Chloroform/Amylalkohol (25:24:1)	Roth
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Salzsäure	Riedel de Haën
N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (TEMED)	Serva
Aprotinin	Bayer
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Fluka
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Fluka
X-Gal	Roth

4.1.8. Molekulargewichtsstandards

DNA: „1 kb DNA Ladder“ (1 µg/µl)	Gibco BRL
RNA: „0.24-9.5 kb RNA Ladder“ (1 µg/µl)	Gibco BRL
Protein: „SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range“	BioRad
„SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range“	BioRad

4.1.9. Nährmedien und Zusätze

α-MEM	GibcoBRL
DMEM	Seromed
DMEM Ham's F12	Seromed
OptiMEM	GibcoBRL
Fötale Kälberserum (FCS)	GibcoBRL
L-Glutamin (200 mM)	GibcoBRL
Natriumpyruvat (100 mM)	GibcoBRL
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml (Pen.) bzw. 5000 µg/ml (Strep.))	GibcoBRL
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 1 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar-Platten	LB-Medium 1,5 % Bacto-Agar

4.1.10. Puffer

PBS	10 mM Natriumphosphat, pH 7,4 150 mM NaCl
PBS für Zellkultur	10 mM Natriumphosphat, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM KCl
PBS/EDTA	PBS für Zellkultur 2 mM EDTA
Natrium-Phosphatpuffer	1 M Na ₂ HPO ₄ Einstellen mit 1 M NaH ₂ PO ₄ auf pH 6,8
1x TBE	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl
AP-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ (für Western Blot (4.2.2.4.))
2x GEBS	50 mM EDTA, pH 8,0 20 % Glycerol 0,5 % Sarkosyl 0,25 % Bromphenolblau
„High SDS“-Hybridisierungslösung	7 % SDS 50 % deionisiertes Formamid 5x SSC 2 % Blockierungsreagenz 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 0,1 % N-Lauroylsarcosin
Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl, einstellen auf pH 7,5
Waschpuffer für DIG-Detektion	Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20
Blockierungslösung für DIG-Detek.	1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Lysepuffer (,Transporter')	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % NP-40 1 mM PMSF 100 U/ml Aprotinin

Lysepuffer (,PSA')	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM MgCl ₂ 2 mM EDTA 1 % NP-40 1 mM PMSF 100 U/ml Aprotinin
2x Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % Glycerin 5 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin 0,1% SDS
Western Blotpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin
RNA Auftragspuffer	50 % Formamid 2,2 M Formaldehyd 10 mM EDTA 20 % Glycerol 0,2 % Bromphenolblau 50 mg/ml Ethidiumbromid
RNA Laufpuffer	20 mM MOPS, pH 7,0 8 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungslösung (für Southern Blot (4.2.3.9.))	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung (für Southern Blot (4.2.3.9.))	1 M Tris-HCl, pH 7,4 1,5 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

4.1.11. Sonstige Materialien

Deckgläschen (Ø 12 mm)	Jürgens
Einmal-Injektionskanülen (Ø 0,8 mm)	Braun
Filterpapier 3 MM	Whatman
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech
Kryoröhrchen	Corning
Millex GV Filter (0,22 µm steril)	Milipore
Nitrocellulose (Protran)	Schleicher & Schuell
Polystyrolröhrchen	Greiner
Qiabrane Nylonmembran	Qiagen

Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Universalindikatorpapier, pH 0 - 14	Macherey-Nagel
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner
Lochplatten	Greiner

4.1.12. „Kits“

„High Pure Plasmid Isolation Kit“	Roche
„NucleoSpin Plasmid Kit“	Macherey & Nagel
„Plasmid Kit (Midi u. Maxi)“	Qiagen
„GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“	Amersham Pharmacia Biotech
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Qiagen
„QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen
„GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge System“	GibcoBRL
„NucleoSpin Extract Kit“	Macherey & Nagel
„Rapid DNA Ligation Kit“	Roche
„pGEM-T-Vector Systems“	Promega
„QIAquick RNA Isolation Kit“	Qiagen
„QuickPrep <i>Micro</i> mRNA Purification Kit“	Amersham Pharmacia Biotech
„SuperScript II RNaseH ⁻ RT Kit“	GibcoBRL
„5'-RACE Kit“	Roche
„DIG RNA Labeling Kit“	Roche
„PCR DIG Probe Synthesis Kit“	Roche
„ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“	PE Biosystems
„T7-Sequencing Kit“	Amersham Pharmacia Biotech

4.1.13. Geräte

Blotkammer Fast-Blot B33	Biometra
Brutschrank	Heraeus
373 DNA Sequencer	Applied Biosystems
Easy Enhanced Analysis System (Easy RH-3, Videokamera 429K)	Herolab
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
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
Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

4.1.14. Software

Corel DRAW 9

Corel PHOTO-PAINT 9

Lasergene DNASStar

Microsoft Word für Windows 2000

Reference Manager Professional Edition, Version 9

4.2. Methoden

4.2.1. Zellbiologische Methoden

4.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ kultiviert. Die CHO K1-Zellen wurden in DMEM Ham's F12 Medium mit 1 mM Natriumpyruvat und 5 % FCS kultiviert. COS-7-Zellen wurden in DMEM mit 5 % FCS und 2 mM L-Glutamin, alle Lec8- und Lec2-Zellen wurden in Alpha-Medium mit 10% FCS und 2 mM Glutamin kultiviert. Alle Medien sind mit Penicillin (50 U/µl) und Streptomycin (50 µg/ml) supplementiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (alle 3 bis 4 Tage). Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgte durch Inkubation für einige Minuten mit PBS/EDTA.

4.2.1.2. Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend tropfenweise mit 20 Volumen des entsprechenden Mediums verdünnt. Nach Zentrifugation (200xg, 10 min, RT) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

4.2.1.3. Einfrieren von Zellen

Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden die Zellen zentrifugiert (200xg/10 min/RT). Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -70°C vorgefroren. Nach mindestens 24 h wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

4.2.1.4. Anlagerung von Antikörpern an Petrischalen

Die sterilfiltrierte Antikörperlösung (5 µg/ml mAk 735 in 50 mM Tris-HCl, pH 9,5) wurde für mindestens 6 Stunden bei 4°C an Petrischalen angelagert. Nach der Anlagerung wurden die Schalen dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Anschließend wurden die Petrischalen dreimal mit

PBS gewaschen und bei -20°C gelagert. Die Antikörperlösung wurde direkt für zwei bis drei weitere Beschichtungen wiederverwendet.

4.2.1.5. Selektion von Zellen durch „Panning“

Zur Trennung von PSA-positiven und PSA-negativen Zellen wurde die Zellsuspension auf mAk 735 beschichtete Petrischalen gegeben und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert (Wysocki und Sato, 1978). PSA-positive Zellen wurden von dem Antikörper auf der Plastikoberfläche festgehalten. Die PSA-negativen Zellen wurden nach der Inkubation vorsichtig abgenommen und in einer neuen Zellkulturflasche weiter kultiviert.

4.2.1.6. Transiente Transfektion mit Lipofectamine

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte in 24-Loch Platten auf Deckgläschen, in 6-Loch Platten und in Petrischalen. Die Konfluenz vor der Transfektion betrug etwa 70%. Die Zellen wurden dreimal mit OptiMEM gewaschen und für 6 Stunden mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. Zur Herstellung von 1 ml Transfektionsgemisch (für 1 Loch einer 6-Loch Platte) wurden 1µg DNA und 6 µl Lipofectamine in je 100 µl OptiMEM vorverdünnt und dann in einem Polystyrolröhrchen gemischt (Felgner *et al.*, 1987). Nach Inkubation für 15-30 min bei RT und Zugabe von 800 µl OptiMEM wurde das Gemisch auf die gewaschenen Zellen gegeben. Die Transfektion wurde durch Zugabe von 2 Volumina Medium gestoppt. Für Ansätze anderer Größenordnung wurden die Mengen an DNA, Lipofectamine und OptiMEM der Anzahl der zu transfizierenden Zellen bzw. der Fläche des Zellrasens angepasst. Für Immunfluoreszenzen wurden die Zellen anschließend für 24-48 h, für die Analysen im Western Blot und in der Immuncytochemie für 48-72 h kultiviert.

4.2.1.7. Immuncytochemische Darstellung PSA-positiver Zellen

Zum immuncytochemischen Nachweis (Harlow und Lane, 1988) von PSA wurden die Zellen nach entsprechender Kultivierung einmal mit PBS gewaschen, durch 5-minütige Inkubation mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und anschließend getrocknet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 2% Magermilch in PBS für 30 Minuten abgesättigt. Anschließend

wurden die Zellen für 60 Minuten mit dem mAk 735 in 2% Magermilch und nach dreimaligem Waschen mit PBS für weitere 60 Minuten mit einem AP-konjugierten anti-Maus Ig Antikörper inkubiert. Die AP-Aktivität wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS und AP-Puffer durch eine Farbreaktion mit NBT/BCIP (165 bzw. 330 mg/ml in AP-Puffer) nachgewiesen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zur Inhibierung endogener AP-Aktivität wurde der Färbelösung im Einzelfall 5 mM Levamisol zugegeben.

4.2.1.8. Immunfluoreszenz

24-48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd (20 min; RT) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Digitonin (5 µg/ml in 0,3 M Sucrose; 0,1 M KCl; 2,5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 10 mM HEPES, pH 6,9) für 20 Minuten bei 4°C permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit 0,1% BSA in PBS für 30 Minuten bei RT abgesättigt. Den Kontrollzellen wurde 0,2% Saponin zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembranen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (anti-FLAG mAk M5, 5,4 µg/ml oder anti-HA mAk 12CA5, 2,5 µg/ml) und dem polyklonalem anti- α -Mannosidase II Serum (1:2000) in 0,1% BSA in PBS für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% BSA in PBS wurden die Zellen mit dem Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG und dem Alexa 448-konjugierten anti-Kaninchen IgG (jeweils 1:500) in 0,1% BSA in PBS als sekundäre Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss an dreimaliges Waschen mit 0,1% BSA in PBS und einmaliges Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen in Moviol fixiert, lichtgeschützt über Nacht bei RT getrocknet und unter dem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.2.2. Proteinchemische Methoden

4.2.2.1. Lysieren von Zellen

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert (1000xg, 10 min, 4°C). Das Volumen der Zellen wurde abgeschätzt und die Zellen wurden in etwa 10 Volumina Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000xg, 2 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und entweder sofort mit Laemmli-Puffer versetzt, enzymatisch behandelt oder bei -70°C eingefroren.

4.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zelllysate wurden in SDS-Polyacrylamidgelen bestehend aus einem 3%igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 3% Polyacrylamid) und einem 7%igen bzw. 15%igen Trenngel (375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 7% bzw. 15% Polyacrylamid) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Als Acrylamid-Stammlösung wurde eine 30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% N,N'-Methylen-diacrylamid verwendet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% TEMED und 1% Ammoniumpersulfat initiiert. Die Proben in Laemmli-Puffer wurden entweder für 20 Minuten bei Raumtemperatur (Zucker-Nukleotid Transporter) oder bei 60°C (PSA) denaturiert. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 8 V/cm im Sammelgel und nach Erreichen des Trenngels bei 20 V/cm in SDS-PAGE Elektrophoresepuffer.

4.2.2.3. Western Blot Analyse

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer "Fast Blot B-33"-Blotkammer (Biometra) bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² für 1 h auf Nitrocellulose transferiert (Kyhse-Andersen, 1984; Harlow und Lane, 1988). Gel und Nitrocellulosemembran wurden zwischen je drei Lagen mit Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin) getränktem Filterpapier (Whatman) gelegt. Zur Überprüfung des Transfers und zur Markierung der Molekulargewichtsstandards wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung (0,2% w/v Ponceau S in 3% TCA) gefärbt und unter fließendem Wasser entfärbt.

4.2.2.4. Entwicklung von Western Blots mit Antikörpern

Die Nitrocellulosemembranen wurden für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C in 2% Magermilch in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (5 µg/ml bei gereinigten mAks) in 2 % Magermilch in PBS erfolgte für 1 h. Anschließend wurden die Membranen dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und für 30-60 min mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-Ig AP-Konjugat, 1:2000 in 2% Magermilch in PBS) inkubiert (Harlow und Lane, 1988; During, 1991). Nach je zweimaligem Waschen mit PBS und TBS und Äquilibrieren mit AP-Puffer wurden die Membranen mit BCIP und NBT (165 bzw. 330 mg/ml in AP-Puffer) gefärbt. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit Wasser gestoppt.

4.2.3. Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1. „Quick Checks“ von Plasmiden

100 µl Bakterienkultur wurden mit 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 10 µl Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Glycerin) versetzt, kräftig durchmischt und zentrifugiert (14000xg, 10 min, RT). 30 µl des Überstandes wurden im Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.2.3.8.) und die Größe der Plasmid-DNA überprüft.

4.2.3.2. Analytische Plasmidpräparation

1,5 ml Bakterienkultur wurden zentrifugiert (7000xg, 1 min, RT) und die Bakterien anschließend in 100µl „Puffer 1“ (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Durch 5-minütige Inkubation mit 100 µl „Puffer 2“ (1% SDS, 0,2 M NaOH) wurden die Bakterien lysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 100 µl gekühltem „Puffer 3“ (3 M Kaliumacetat pH 5,5) und 5-minütige Inkubation auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (14000xg, 10 min, RT) wurde der Überstand mit 250 µl Isopropanol versetzt und die DNA 5 min bei RT präzipitiert. Nach der Zentrifugation (14000xg, 10 min, RT) wurde die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung im Vakuum wurde die DNA in 20 µl H₂O aufgenommen.

4.2.3.3. Mini-Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus bis zu 5 ml Bakterienkultur wurde mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kits“ (Roche) oder des „NukleoSpin Plasmid Kits“ (Macherey-Nagel) nach den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien einer 4,5 ml Flüssigkultur zentrifugiert (14000xg, 1 min, RT) und in 250 µl „Puffer 1“ resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl „Puffer 2“ wurde vorsichtig gemischt und die Bakterien für 5 min bei RT lysiert. Danach erfolgte die Zugabe von 350 µl „Puffer 3“ und 5 min Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation (14000xg, 10 min, 4°C) wurde der Überstand auf eine Minisäule aufgetragen. Nach Zentrifugation (14000xg, 1 min, RT) wurde die an die Säule gebundene DNA mit 700 µl (bzw. 600 µl und 200 µl) „Waschpuffer“ gewaschen und anschließend in 50 µl H₂O eluiert.

4.2.3.4. Midi-Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus bis zu 100 ml Bakterienkultur wurde mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Kit Midi“ (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien einer 100 ml Flüssigkultur zentrifugiert (6000xg, 15 min, 4°C) und in 4 ml „Puffer P1“ resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml „Puffer P2“ wurde vorsichtig durchgemischt und die Bakterien für 5 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml kaltem „Puffer P3“ gestoppt. Nach 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (20000xg, 30 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und gegebenenfalls erneut zentrifugiert. Die Säule (QIAGEN-Tip 100) wurde in der Zwischenzeit durch Zugabe von 4 ml „Puffer QBT“ äquilibriert. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde zweimal mit 10 ml „Puffer QC“ gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 5 ml „Puffer QF“. Anschließend wurde die DNA mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und zentrifugiert (20000xg, 30 min, 4°C). Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, im Vakuum getrocknet und in 100-250 µl H₂O aufgenommen.

4.2.3.5. Phenol/Chloroform Behandlung von DNA

Zur Entfernung von Proteinkontaminationen aus DNA-Lösungen wurde die Lösung mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Amylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt. Das Gemisch wurde

kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (14000xg, 5 min, RT). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA daraus präzipitiert.

4.2.3.6. Präzipitation von DNA

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an kaltem 96%igem Ethanol versetzt. Alternativ wurde statt Ethanol auch 1 Volumen Isopropanol eingesetzt. Die DNA wurde dann bei -20°C oder -70°C für mindestens 10 min präzipitiert. Nach der Zentrifugation (14000xg, 30 min, 4°C) wurde die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000xg, 10 min, 4°C). Die DNA wurde im Vakuum getrocknet und in H₂O aufgenommen.

4.2.3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen (DNA und RNA) wurde photometrisch durch UV-Absorptionsmessung bei 260, 280 und 320 nm in einer Quarzglasmikroküvette bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 entspricht etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt. Bei optimaler Reinheit beträgt der Quotient 1,8 bis 2,0. Geringe DNA-Konzentrationen wurden nach Auftrennung im Agarosegel durch den Vergleich mit bekannten DNA-Konzentrationen (z.B. vom Molekulargewichtsstandard) abgeschätzt.

4.2.3.8. Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben wurden in GEBS aufgenommen und in horizontalen Gelen mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,5% und 2,0% aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von etwa 5 V/cm mit 1xTBE als Laufpuffer. Die Gele wurden nach der Auftrennung in Ethidiumbromidlösung (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 (Easy RH-3, Videokamera 429K) verwendet.

4.2.3.9. Southern Blot

Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA wie unter 4.3.2.8. beschrieben in einem Agarosegel aufgetrennt. Zur Fragmentierung von DNA-Molekülen über 10 kb wurde das Gel 10 min in 250 mM HCl inkubiert und anschließend nacheinander für je 30 min in Denaturierungs- und Neutralisierungslösung gespült. Das Gel wurde abschließend für 30 min in 20xSSC äquilibriert. Die Übertragung der DNA auf die Nylonmembran erfolgte durch Kapillartransfer mit 20xSSC als Transferpuffer für 16 h in einer Transferpyramide mit einer Pufferkammer und puffergetränkten Filterpapieren unter dem Gel und der Membran, trockenem Filterpapier, saugfähigem Papier und einem Gewicht über dem Gel (Southern, 1975). Auf der noch feuchten Nylonmembran wurden die Geltaschen markiert und die DNA durch UV-Bestrahlung in dem „Stratalinker“ kovalent fixiert.

4.2.3.10. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die im Agarosegel aufgetrennten und mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus der Gelmatrix wurden der „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen), der „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) oder der „NucleoSpin Extract Kit“ (Macherey-Nagel) nach Anweisungen der Hersteller verwendet. Das Prinzip war bei allen „Kits“ ähnlich: das ausgeschnittene Gelstück wurden je nach Gewicht mit dem entsprechenden Volumen an „Capture Buffer“ oder äquivalentem Puffer versetzt. Durch Inkubation bei 50°C wurde das Gelstück vollständig aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und zentrifugiert (14000xg, 1 min, RT). Das Filtrat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl „Wash Buffer“ oder äquivalentem Puffer durch erneute Zentrifugation gewaschen. Die DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert.

4.2.3.11. Endonukleaseverdau von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen in einem Volumen von 10 µl bis 100 µl in dem vom Hersteller angegebenen Puffer (NEB 1 bis 4) verdaut (37°C, 1-2 h). Pro µg DNA wurden etwa 5 U Restriktionsenzym eingesetzt.

4.2.3.12. Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Ligation eine Religation von linearisierten Vektoren mit k hasiven Enden zu verhindern, wurden die Enden vor der Ligation dephosphoryliert. Dazu wurde etwa 1 µg linearisierter Vektor mit 1 U Alkalischer Phosphatase in Dephosphorylierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,1 mM EDTA) für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Alkalische Phosphatase auch direkt nach dem Endonukleaseverdau des Vektors zugegeben.

4.2.3.13. Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotidadaptern

Jeweils 10 µl der zu hybridisierenden und am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide wurden zusammen für 2 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz langsam in einem Wasserbad oder Metallblock auf RT abgekühlt. Zur Ligation wurden 1 bis 2 µl einer 1:1000-Verdünnung des Ansatzes (50 bis 100 fmol Oligonukleotidadapter) und 5 bis 10 fmol geschnittener Vektor eingesetzt.

4.2.3.14. Ligation von DNA

20 fmol linearisierter und gegebenenfalls dephosphorylierter Vektor wurden mit 60 bis 100 fmol des zu ligierenden Fragmentes in 20 µl T4 DNA-Ligasepuffer (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.

Ligationen mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Vektor und das zu ligierende Fragment wurden in einem molaren Verhältnis zwischen 1:2 und 1:6 bei einer DNA-Gesamtmenge von ca. 200 ng in 10 µl „1x Dilution Buffer“ 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- berh ngen wurde das „pGEM-T Vector-System Kit“ (Promega) benutzt. Der Ansatz 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 für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Nach der Ligation wurden die Ansätze in *E. coli* DH5α transformiert.

4.2.3.15. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* DH5 α

100 ml LB-Medium wurden mit 500 μ l einer Vorkultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 5 min auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (12000xg, 10 min, 4°C) und die Bakterien in 4x10 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einmaligem Waschen mit 50 mM CaCl₂ und erneuter Zentrifugation (12000xg, 10 min, 4°C) wurden die Bakterien in 4x10 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und wieder zentrifugiert (12000xg, 10 min, 4°C). Die Bakterien wurden in insgesamt 4 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen (Dagert und Ehrlich, 1979). Nach Inkubation auf Eis für 20 min und Zugabe von 400 μ l Glycerin 87% (v/v) wurden die Bakterien als 200 μ l-Aliquots bei -70°C eingefroren. Alle verwendeten Lösungen und Gefäße waren auf Eis vorgekühlt.

4.2.3.16. Transformation von *E. coli* DH5 α

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 μ l CaCl₂-kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe eines Ligationsansatzes bzw. 10 ng Plasmid-DNA wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 200 μ l LB-Medium wurden die Bakterien 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB/Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3.17. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurde zur Amplifikation von DNA Fragmenten mit Oligonukleotiden durchgeführt, die von der Sequenz abgeleitet wurden. In einem 100 μ l Reaktionsansatz wurden 1-100 ng DNA, je 1 mmol der beiden flankierenden Oligonukleotide, 1xPuffer, je 20 mmol dNTPs und 1 U DNA-Polymerase eingesetzt. Als DNA-Polymerasen wurde die *Taq*- (Sigma) und die *Pfu*- (Stratagene) Polymerase eingesetzt, wobei die *Pfu*-Polymerase wegen ihrer größeren Genauigkeit bei der Amplifikation von cDNA-Konstrukten verwendet wurde.

Nach einer Denaturierung bei 94°C für 3 min wurde die Reaktion in 20-30 Zyklen durchgeführt: Anlagerung der Oligonukleotide bei einer Temperatur, die 2°C unter der niedrigsten der für die beiden Oligonukleotide berechneten Schmelztemperaturen liegt, für 15 sec, Strangverlängerung für 30 sec bis zu 3 min

(etwa 1 min pro 1000 bp zu amplifizierender DNA) bei 70°C und Denaturierung der DNA bei 94°C für 30 sec. Alle Reaktionen wurden im „GeneAmp System 2400“ (Perkin Elmer) durchgeführt.

4.2.3.18. Gezielte Mutagenese von DNA

Gezielte Mutationen wurden in zwei Schritten in eine DNA-Sequenz eingeführt. Je Mutation wurden zwei Mutagenese-PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die eine Mutation bezogen auf die Matrizen DNA enthalten und einem weiteren 3'- oder 5'-liegenden Oligonukleotid. Die beiden Mutagenese-Oligonukleotide wurden dabei so ausgewählt, dass sie sich im Bereich der Mutation überlappen. So entstanden im ersten Durchgang zwei Fragmente, die am Ende eine Mutation enthalten und sich dort überlappen. Der Reaktionsansatz wurde wie zuvor beschrieben in einer 100 µl Reaktion angesetzt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: Nach der Denaturierung bei 94°C für 3 min wurden die Oligonukleotide zunächst in zwei Zyklen bei 42°C angelagert. Nach einer Strangverlängerung bei 58°C für 30 sec bis 3 min (siehe 4.2.3.17.) wurde wieder bei 94°C für 30 sec denaturiert. Dadurch wurde den Oligonukleotiden die Möglichkeit gegeben, sich bei einer niedrigen Anlagerungstemperatur der Mutation an die Matrizen-DNA anzulagern. Nach diesen beiden Zyklen wurde die Amplifikation der DNA wie in der unter 4.2.3.17. beschriebenen PCR durchgeführt. In einer zweiten Reaktion (Fusions-PCR) wurden die beiden mit Mutationen versehenen Fragmente an ihrer überlappenden Stelle fusioniert. Die Fusions-PCR wurde wie die Mutagenese-PCR durchgeführt mit dem Unterschied, dass im Reaktionsansatz statt einer Matrizen DNA jeweils etwa 100 ng der beiden Produkte der vorangegangenen Mutagenese-PCR eingesetzt werden. Zwei flankierende Oligonukleotide ermöglichten die Amplifikation eines großen Fragments mit der eingeführten Mutation. Die beiden Zyklen bei geringerer Temperatur ermöglichen in diesem Fall die Anlagerung der beiden sich überlappenden Matrizen.

4.2.3.19. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zelllinien

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte jeweils aus etwa 5×10^7 Zellen. Sie erfolgte entweder mit Hilfe des „QIAquick RNA Isolation Kits“ (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers oder über Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten

(Chirgwin *et al.*, 1979). Dazu wurden die Zellen nach Waschen mit PBS in 7.5 ml GCN-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 25 mM Natriumacetat, pH 5,5; 1% β -Mercaptoethanol) lysiert und durch wiederholtes Aufziehen in eine Spritze mit Kanüle homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde über ein CsCl-Kissen (5 ml 96% CsCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA) geschichtet und zentrifugiert (150000xg, 18 h, 16°C). Anschließend wurde die RNA in 400 μ l TE gelöst und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung zur Aufreinigung von Poly(A)⁺ RNA eingesetzt.

4.2.3.20. Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺ RNA erfolgte über Oligo(dT)-Cellulose mit Hilfe des „QuickPrep *Micro* mRNA Purification Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Anweisungen des Herstellers. Die Gesamt-RNA in einem Volumen von 400 μ l wurde mit dem zweifachen Volumen an Elutionspuffer versetzt und auf die zentrifugierten Oligo-dT-Cellulose gegeben. Nach Inkubation für 3 min unter Schütteln wurde die Cellulose dreimal mit „High Salt Buffer“ und zweimal mit „Low Salt Buffer“ gewaschen (jeweils Zentrifugation (1 min, 14000xg, RT)). Die Cellulose in 300 μ l „Low Salt Buffer“ wurde auf eine Micro Spin Säule überführt und zentrifugiert (1 min, 14000xg, RT). Die Poly(A)⁺-RNA wurde dreimal mit je 150 μ l Elutionspuffer (65°C) eluiert. Zur Ankonzentrierung wurde die eluierte Poly(A)⁺-RNA mit Natriumacetat und Glykogen als Träger präzipitiert und in 20 μ l H₂O aufgenommen. Der RNA-Gehalt sowie die Reinheit wurde photometrisch bestimmt.

4.2.3.21. Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Poly(A)⁺-RNA (1-5 μ g) wurde in einem 1%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (1x RNA-Laufpuffer, 0,5 M Formaldehyd) aufgetrennt. Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag in einem äquivalenten Volumen RNA Auftragspuffer für 5 min bei 70°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 3,5 V/cm.

4.2.3.22. Northern Blot

Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die Poly(A)⁺-RNA (siehe 4.2.3.20.) wie unter 4.2.3.21. beschrieben aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 20 min

in 20xSSC äquibriert. Die Übertragung der RNA auf die Nylonmembran erfolgte durch Kapillartransfer mit 20xSSC als Transferpuffer für 16 h in einer Transferpyramide mit einer Pufferkammer und puffergetränkten Filterpapieren unter dem Gel und der Membran, trockenem Filterpapier, saugfähigem Papier und einem Gewicht über dem Gel (Sambrook *et al.*, 1989). Auf der noch feuchten Nylonmembran wurden die Geltaschen markiert und die RNA durch beidseitige UV-Bestrahlung in dem „Stratalinker“ kovalent fixiert (Vgl. 4.2.3.9.).

4.2.3.23. Methylenblaufärbung von RNA-Markern

Der RNA Molekulargewichtsstandard wurden vor der Entwicklung des Northern Blots angefärbt. Dazu wurde er nach der Fixierung der RNA durch UV-Licht mit einem Skalpell abgetrennt, für 5 min in die Färbelösung (0,5% Methylenblau; 0,3 M Natriumacetat, pH 5,2) gelegt und anschließend in Wasser entfärbt.

4.2.3.24. RT-PCR

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des „SuperScript II RNaseH⁻ RT Kit“ (GibcoBRL) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 500 bis 1000 ng Poly(A)⁺-RNA wurde mit 1 µl des spezifischen Oligonukleotids SO47 (10 µM) in einer 12 µl Reaktion bei 70°C für 10 min denaturiert. Nach Inkubation auf Eis für 2 min wurde das Gemisch mit 4 µl „5x First Strand Buffer“ (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 4x 10 mM dNTP versetzt. Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C äquibriert und dann mit 1 µl SuperScript II (Gibco BRL) versetzt. Die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 42°C. Nach einer Hitzeinaktivierung für 10 min bei 94°C wurde der cDNA-Erststrang mit Hilfe des „GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge System“ (GibcoBRL) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die Elution des cDNA-Erststrangs erfolgte in 50 µl H₂O. Die PCR wurde mit 5-10 µl gereinigtem cDNA-Erststrang als Matrize durchgeführt. Es wurden zwei PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (SO45/SO46 und SO11/SO48) und jeweils 40 Zyklen durchgeführt, bei denen sich das zweite Paar Oligonukleotide innerhalb des im ersten Durchgang amplifizierten PCR-Produkte anlagert („nested“ PCR).

4.2.3.25. Amplifizierung von 5'-Enden (5'-RACE)

Wie unter 4.2.3.24. beschrieben wurden 400 ng poly(A)⁺-RNA mit Oligonukleotid SO6 revers transkribiert. Die cDNA wurde mit dem „GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge System“ (GibcoBRL) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die folgende Amplifikation wurde mit Hilfe des „5'-RACE Kits“ (Roche) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde der spezifisch transkribierten cDNA zunächst ein poly(A)-Schwanz angehängt. 17,5 µl aufgereinigte cDNA wurden mit 2,5 µl „10xReaction Buffer“, 2,5 µl 2 mM dATP und 1,5 µl 25 mM MgCl₂ in einer 25 µl Reaktion angesetzt. Der Ansatz wurde für 2 min bei 100°C denaturiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 14000xg, RT). Nach Zugabe von 1 µl Terminaler Transferase (Roche) wurde die Reaktion für 10 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend für 10 min bei 70°C inaktiviert. 5 µl der cDNA mit poly(A)-Schwanz wurden als Matrize in eine PCR (siehe 4.2.3.17.) eingesetzt. Die erste PCR wurde mit einem cDNA spezifischen und einem oligo-dT Oligonukleotid (SO7/ME44) durchgeführt. Eine zweite PCR wurde mit den Oligonukleotiden SO4/ME45 durchgeführt. Beide PCRs erfolgten in je 40 Zyklen.

4.2.3.26. Markierung von Sonden mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG)

Zur Hybridisierung und Detektion von DNA oder RNA auf Nylonmembranen wurden mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG) markierte Sonden verwendet (Höltke und Kessler, 1990). Bei dieser nicht-radioaktiven Methode kann die Sonde über einen spezifischen Antikörper detektiert werden. Die Sonden wurden auf zwei Wegen synthetisiert: DNA Sonden wurden in einer PCR-Reaktion generiert, RNA Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt.

Die DIG-markierten PCR-Sonden wurden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) nach den Anweisungen des Herstellers generiert. Das Verhältnis von dTTP zu DIG-dUTP wurde auf 2:1 eingestellt. Die PCR wurde wie unter 4.2.3.17. beschrieben durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde direkt ohne weitere Aufreinigung 1:1000 für Hybridisierungen eingesetzt.

Zur Herstellung von RNA-Sonden wurden 2 µg des Matrizen-DNA enthaltenden Plasmids durch Endonukleaseverdau hinter der abzulesenden Sequenz linearisiert, nach Auftrennung in einem Agarosegel aufgereinigt, mit Phenol/Chloroform behandelt und präzipitiert. Für die *in vitro*-Transkription wurde die linearisierte

Matrizen-DNA in 28 µl DMPC-H₂O, 4 µl „Transcription Buffer“, 4 µl „DIG-RNA Labeling Mix“ (Roche) und 4 µl T7 RNA Polymerase aufgenommen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Nach Präzipitation mit Ethanol wurde die RNA-Sonde in 100 µl DMPC-H₂O aufgenommen. Für Northern Blot Analysen wurden die Sonden 1:1000 bis 1:5000 in „High SDS“-Puffer verdünnt.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz und der Spezifität der Sonde wurde sie in einem „Dot-Blot“ analysiert. Dazu wurden spezifische und unspezifische DNAs in verschiedenen Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetropft und anschließend mit UV-Licht immobilisiert. Die Membran wurde dann wie unter 4.2.3.27. beschrieben hybridisiert.

4.2.3.27. Hybridisierungen

Hybridisierungen wurden mit Northern Blots, Southern Blots, „Dot-Blots“ und Bakterienkolonien auf Nylonmembranen nach dem „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ (Roche) durchgeführt. Bei Hybridisierungen sowohl mit DIG-markierten RNA- als auch DNA-Sonden wurden die Nylonmembranen zunächst für eine bis drei Stunden in „High SDS“ Hybridisierungslösung in einer Hybridisierungsröhre bei 42°C (PCR-Sonde) bzw. 65°C (RNA-Sonde) vorinkubiert. Dann wurde die Sonde in „High SDS“ verdünnt, bei 65°C denaturiert, zu den vorinkubierten Membranen gegeben und bei 42°C bzw. 65°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit 2x SSC/0,1% SDS für je 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden sie dreimal mit 0,1x SSC/0,1% SDS für je 15 min bei 68°C gewaschen. Nach Äquilibrieren der Membran in kaltem Waschpuffer wurde sie durch Schütteln in Blockierungslösung für 30 min bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit anti-Digoxigenin AP-Konjugat (Roche) 1:10000 in Blockierungslösung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss daran dreimal mit Waschpuffer für je 30 min bei RT gewaschen. Nach Äquilibrieren der Membran in AP-Puffer wurden einige Tropfen CSPD (Roche) auf die feuchte Membran gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das CSPD entfernt und die Membran eingeschweißt. Nach weiteren 15 min Inkubation bei 37°C wurden Filme für 1-30 min exponiert.

4.2.3.28. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977). Zu Beginn der Arbeit wurde das „T7 Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Dazu wurden 2 µg Plasmid-DNA in 8 µl H₂O durch Zugabe von 2 µl 2 M NaOH für 10 min bei RT denaturiert. Durch Zugabe von 3 µl 3 M NaAc, pH 5,2; 7 µl H₂O und 60 µl EtOH wurde die DNA gefällt. Die DNA wurde mit 70% EtOH gewaschen und die getrocknete DNA in 10 µl H₂O gelöst. Nach Zugabe von 2 µl „Annealing-Puffer“ und 10 pmol des spezifischen Oligonukleotids wurde die DNA für 20 min bei 37°C und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Die Markierungs- und Terminationsreaktion wurde unter Verwendung des oben genannten „Kits“ nach den Anweisungen des Herstellers mit 2.5 µCi α-³⁵S-dATP pro Reaktion durchgeführt. Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden in 8%igen Acrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt (7,6% Acrylamid, 0,4% N,N'-Methylendiacylamid, 7 M Harnstoff in TBE-Puffer). Nach Vorlauf des Gels in TBE-Puffer und Auftrag der Proben erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 70 Watt. Die Gele wurden anschließend für 20 min in 5% Methanol/5% Essigsäure fixiert, auf Filterpapier transferiert und nach dem Trocknen bei 80°C im Vakuum über Nacht exponiert.

Später wurden Sequenzierungen mit dem „ABI Dye Cycle Sequencing Kit“ (PE Biosystems) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 500 ng Matrizen DNA mit 10 pmol Oligonukleotid und 4 µl „Sequenziermix“ in einer 10 µl Reaktion in eine Sequenzierungs-PCR eingesetzt. Nach dem Aufheizen auf 94°C wurden das Oligonukleotid in 25 Zyklen bei 50°C für 5 sec angelagert. Die Strangverlängerung fand bei 60°C für 4 min statt, bevor die Stränge am Ende bei 96°C für 10 sec wieder denaturiert wurden. Die PCR-Produkte wurden in Ethanol gefällt, in 4 µl Auftragspuffer aufgenommen und auf das Acrylamidgel im 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems) aufgetragen.

Einzelne Sequenzierungen wurden in Auftragsarbeit von der Firma MWG durchgeführt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Klonierung des Hamster UGT

Ziel der Arbeit war die Struktur-Funktions-Analyse des Hamster UDP-Galactose Transporters (UGT). Die Sequenz des humanen UGT war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt (Miura *et al.*, 1996). Vom CMP-Sialinsäure Transporter (CST) waren zu diesem Zeitpunkt die Sequenzen vom Hamster (Eckhardt *et al.*, 1996) und Menschen (Ishida *et al.*, 1996) bekannt. Beide Sequenzen sind sehr hoch konserviert (95% Identität). Unter der Annahme, dass die UGT Sequenzen vom Menschen und Hamster ebenfalls sehr homolog sind, wurde der Versuch unternommen, den Hamster UGT über einen Homologieansatz zu isolieren. Eine CHO cDNA-Bank transfiziert in *E. coli* DH5 α stand im Labor zur Verfügung (Eckhardt *et al.*, 1995). Durch PCR mit den Oligonukleotiden UGT2 und UGT6 wurde das 3'-Ende (Nukleotide 640-1182) des humanen UGT der Isoform 1 (Miura *et al.*, 1996; GeneBank Nr. D84454) als Sonde mit Digoxigenin markiert (siehe 4.2.3.26.). Die mit der cDNA Bank transformierten Bakterien wurde auf LB-Agar Platten ausgestrichen und inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden anschließend auf Nylonmembranen übertragen. Die Membranen wurden mit der Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert (siehe 4.2.3.27.). Im ersten Durchgang wurden 25 positive Kolonien identifiziert, die in einem zweiten Durchgang erneut mit der Sonde hybridisiert wurden. 10 Bakterienkolonien zeigten ein positives Signal. Nach Isolation und Anzucht in LB/Amp-Medium wurde die Plasmid-DNA dieser Bakterien präpariert. Die Fragmente der cDNA-Bank wurden durch Endonukleaseverdau mit *Xho*I aus dem Plasmid herausgeschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde im Southern Blot Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen und noch einmal mit der Sonde aus dem humanen UGT hybridisiert. Nur ein Plasmid (pABE-SO1) enthielt ein cDNA-Fragment größer als 1 kb, das sich mit der Sonde markieren ließ. Die Sequenzierung des Fragments zeigte ein offenes Leseraster von 1197 bp, das ein Protein mit 398 Aminosäuren kodiert (Abbildung 3). Das berechnete Molekulargewicht beträgt 41,5 kDa. Das cDNA-Fragment enthält darüber hinaus den 3'-untranslatierten Bereich (UTR) mit einem Polyadenylierungssignal und einem poly(A)-Schwanz. Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass die cDNA in pABE-SO1 invers orientiert war, so dass die Herstellung eines aktiven Proteins nicht möglich war.

-9		GATGCCAAC	-1
1	ATGG CAGCGGTTGGGGTTGGCGGATCTGCCGCGGCGGCCGGGGCCAGGGGCCGTATCCGCTGGCGCGCTG		69
1	M A A V G V G G S A A A A G P G A V S A G A L		23
70	GAGCCTGGGTCCGCTACAGCGGCTCACCGGCGCCTCAAGTACATATCCTTAGCTGTGCTGGTGGTCCAG		138
24	E P G S A T A A H R R L K Y I S L A V L V V Q		46
139	AACGCCTCCCTCATCCTTAGCATCCGATATGCTCGTACACTGCCTGGTGATCGCTTCTTTGCCACCACC		207
47	N A S L I L S I R Y A R T L P G D R F F A T T		69
208	GCTGTGGTCATGGCTGAAGTGTAAAGTGTACCTGTCTCCTGCTGCTCTTCGCCCAGAAGAGGGGT		276
70	A V V M A E V L K G V T C L L L L F A Q K R G		92
277	AATGTGAAGCACCTGGTTCTCTTCCTCCACGAGGCTGTCTGGTGAATATGTGGACACACTCAAGCTC		345
93	N V K H L V L F L H E A V L V Q Y V D T L K L		115
346	GCGGTGCCCTCTCTCATCTATACTTTGCAGAATAACCTCCAGTATGTTGCCATCTCCAACCTGCCAGCT		414
116	A V P S L I Y T L Q N N L Q Y V A I S N L P A		138
415	GCCACTTCCAGGTGACATATCAGCTCAAGATCCTGACTACAGCACTGTTCTCCGTGCTCATGTTGAAC		483
139	A T F Q V T Y Q L K I L T T A L F S V L M L N		161
484	CGCAGCTCTCACGCCTGCAGTGGGCCTCCCTGCTGCTGCTCTTCACTGGTGTGGCGATTGTCCAGGCA		552
162	R S L S R L Q W A S L L L L F T G V A I V Q A		184
553	CAGCAAGCTGGTGGGGTGGCCACGGCCACTAGATCAGAATCCCGGGCCGGACTAGCAGCTGTGGTG		621
185	Q Q A G G G G P R P L D Q N P G A G L A A V V		207
622	GCCTCCTGTCTCTCCTCAGGCTTTGCAGGGGTATACTTTGAGAAGATCCTCAAAGGCAGCTCAGGTTCT		690
208	A S C L S S G F A G V Y F E K I L K G S S G S		230
691	GTGTGGCTGCGTAACCTCCAACCTAGGCCTCTTTGGCACAGCACTGGGCCTGGTGGGGCTCTGGTGGCT		759
231	V W L R N L Q L G L F G T A L G L V G L W W A		253
760	GAAGGCACTGCTGTGGCCCGTCGAGGCTTCTTCTTTGGATACACGCCTGCTGTCTGGGGGTGGTACTA		828
254	E G T A V A R R G F F F G Y T P A V W G V V L		276
829	AACCAAGCCTTTGGTGGGCTACTGGTGGCTGTTGTAGTCAAGTACGCTGACAACATCCTCAAGGGCTTT		897
277	N Q A F G G L L V A V V V K Y A D N I L K G F		299
898	GCCACCTCCCTGTCTATTGTGCTGTCCACTGTTGCCTCCATTGCGCTCTTTGGCTTTACCTGGACCCA		976
300	A T S L S I V L S T V A S I R L F G F H L D P		322
967	TTATTTGCCCTGGGCGCTGGGCTCGTCATTGGTGGCGTCTACCTCTACAGCCTTCCCCGAAGTGCAGTC		1035
323	L F A L G A G L V I G A V Y L Y S L P R S A V		345
1036	AAAGCCATAACTTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGGGCCCTGCATTACCAGCAGCCTCCTGGG		1104
346	K A I T S A S A S A S A S G P C I H Q Q P P G		368
1105	CAGCCACCACCACCACCGCAGCTGTCTTCTCGAGGAGACCTCATCACGGAGCCCTTTCTGCCAAAGTTG		1173
369	Q P P P P Q L S S R G D L I T E P F L P K L		391
1174	CTCACCAAGGTGAAGGTT CGTAG CTGCTGGAATTGAAGACACTGGCCTGCCTTCGTTCTCCCTCTCTT		1242
392	L T K V K G S .		398
1243	GCCCTGGCCCAGCTGGGACTAAACTCTTATCAGTATTAGGGGTAGGGTGAAGGAGACATGGGAATTGCC		1311
1312	TGTCCCACCAACCTTGCCACATAGGGCTGCCATGACTAACCTCTGTAAATGGACCCACCTGAACTCC		1380
1381	TGCTATCTTTGCAGTATTCTTAGGTAAGTTCTGCA <u>ATAAA</u> ATGTATTTGCATCTTGAAAAA		1446

Abbildung 3: DNA-(Offenes Leseraster und 3'-untranslatierter Bereich) und Proteinsequenz des Hamster UGT. Das Start- und Terminationskodon ist fett gedruckt. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

5.2. Vergleichende Sequenzanalyse des Hamster UGT

Die Proteinsequenz des Hamster UGT ist mit den Sequenzen der anderen klonierten UGT aus Säugetierspezies sehr homolog (Abbildung 4). Dies war eine erste Bestätigung dafür, dass es sich bei der isolierten cDNA tatsächlich um das Hamster UGT-Gen handelte. Interessanterweise stimmt die Primärsequenz des Hamster UGT am C-Terminus mit der Isoform 2 des humanen UGT (Ishida *et al.*, 1996) überein, während die Sequenz des Maus UGT (Ishida *et al.*, 1999a) mit der humanen Isoform 1 (Miura *et al.*, 1996) identisch ist. Weder in CHO-Zellen noch in den untersuchten Zellen der Maus (Ishida *et al.*, 1999a) konnte eine zweite Isoform isoliert werden. Der Hamster UGT besitzt wie die übrigen UGT aus Säugetierspezies zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen in den Positionen 47 und 159.

Hamster UGT	MAAVGVGGSAAGPGAVSAGALEPGSATAAHRRLKYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLPG--DRF	65
Humaner UGT1	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLKYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLPG--DRF	65
Humaner UGT2	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLKYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLPG--DRF	65
Maus UGT	MAAVGVGGSTAAAGAGAVSSGALEPGSTTAAHRRLKYISLAVLVVQNASLILSIRYARTLPG--DRF	65
<i>S. pombe</i> UGT	MAVKGDDVWKGI-----PMKYIALVLLTVQNSALILTLNYSRIMPGYDDKRY	48
Hamster UGT	FATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVLFLEHAVLVQYVDTLKLAVPSLIYTLQNNLQY	130
Humaner UGT1	FATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVLFLEHAVLVQYVDTLKLAVPSLIYTLQNNLQY	130
Humaner UGT2	FATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVLFLEHAVLVQYVDTLKLAVPSLIYTLQNNLQY	130
Maus UGT	FATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVLFLEHAVLVQYVDTLKLAVPSLIYTLQNNLQY	130
<i>S. pombe</i> UGT	FTSTAVLLNELIKLVVCFVSVGYHQFRKNVGEAKLRAFLPQ-IFGG--DSWKLAIAPAFLYTCQNNLQY	113
Hamster UGT	VAISNLPAAATFQVTYQKILTALFSVLMNRSLSRLQWASL LLLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-	197
Humaner UGT1	VAISNLPAAATFQVTYQKILTALFSVLMNRSLSRLQWASL LLLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-	197
Humaner UGT2	VAISNLPAAATFQVTYQKILTALFSVLMNRSLSRLQWASL LLLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-	197
Maus UGT	VAISNLPAAATFQVTYQKILTALFSVLMNRSLSRLQWASL LLLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-	197
<i>S. pombe</i> UGT	VAAGNLTAAAFQVTYQKILTALFISILLHRRLGPMKWFSLFLLTGGIAIVQLQNLNSDDQMSAGPM	181
Hamster UGT	NPGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKSSGSSVWLRNLQLGLFGTALGLVGLWAAEGTAVARRGFFF	265
Humaner UGT1	NPGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKSSGSSVWLRNLQLGLFGTALGLVGLWAAEGTAVARRGFFF	265
Humaner UGT2	NPGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKSSGSSVWLRNLQLGLFGTALGLVGLWAAEGTAVARRGFFF	265
Maus UGT	NPGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKSSGSSVWLRNLQLGLFGTALGLVGLWAAEGTAVASQGGFFF	265
<i>S. pombe</i> UGT	NPVTGFSAVLVACLISGLAGVYFEKVLKDTNPSLWVRNVQLSFFSLFPCLFTILMKDYHNIANGFFF	249
Hamster UGT	GYTPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFHLDPFLFALGAGLVIG	333
Humaner UGT1	GYTPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFHLDPFLFALGAGLVIG	333
Humaner UGT2	GYTPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFHLDPFLFALGAGLVIG	333
Maus UGT	GYTPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFHLDPFLFALGAGLVIG	333
<i>S. pombe</i> UGT	GYNSIVWLAAILLQAGGGIIVALCVAFADNIMKNFSTSIISIISSLASVYLMDKISLTLFLIGVMLVIA	317
Hamster UGT	AVYLYSLPRSAVKAITSSASASASASGPCIHQPPGQPPPPQLSSRGDLITEPFLPK-LLTKVKGS	398
Humaner UGT1	AVYLYSLPRGAAKAI--ASASASASGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRGDLITEPFLPKSVLVK	393
Humaner UGT2	AVYLYSLPRGAAKAI--ASASASASGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRGDLITEPFLPK-LLTKVKGS	396
Maus UGT	AVYLYSLPRGAVKAI---ASASASGPCIHQPPGQPPPPQLSS-RGDLITEPFLPKSVLVK	390
<i>S. pombe</i> UGT	ATFLYTKP-----ESKPSPSRGTYIP-----MTTQDAAAKDVDPK---H	353

Abbildung 4: Vergleich der Primärstruktursequenzen der UGT isoliert aus Hamster (diese Arbeit), Mensch (Miura *et al.*, 1996, Isoform 1; Ishida *et al.*, 1996, Isoform 2), Maus (Ishida *et al.*, 1999a) und der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Segawa *et al.*, 1999). In allen UGT konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt, in vier der fünf dargestellten Proteinsequenzen konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die UGT-Sequenzen aus Säugetierspezies besitzen zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen in Position 47 und 159.

5.3. Membrantopologie-Modell des Hamster UGT

Alle bekannten Zucker-Nukleotid Transporter sind stark hydrophobe Proteine. Strukturvorhersagen und experimentelle Beobachtungen zeigten, dass es sich bei den Transportern um Typ III Membranproteine mit 6-10 Membrandurchgängen handelt (Hirschberg *et al.*, 1998). Der Hamster UGT ist ebenfalls stark hydrophob. In Strukturvorhersagen (PredictTopology; Rost *et al.*, 1995) wurden zehn Transmembrandomänen (TMD) vorgeschlagen (Abbildung 5). Diese Vorhersage stimmte mit der Membrantopologie des Maus CST überein, für den zehn TMD bereits experimentell bestätigt wurden (Eckhardt *et al.*, 1999). Für den humanen UGT wurden acht Membrandurchgänge vorgeschlagen (Miura *et al.*, 1996). Studien zur experimentellen Aufklärung der Membrantopologie des Hamster UGT werden unter 5.13. beschrieben.

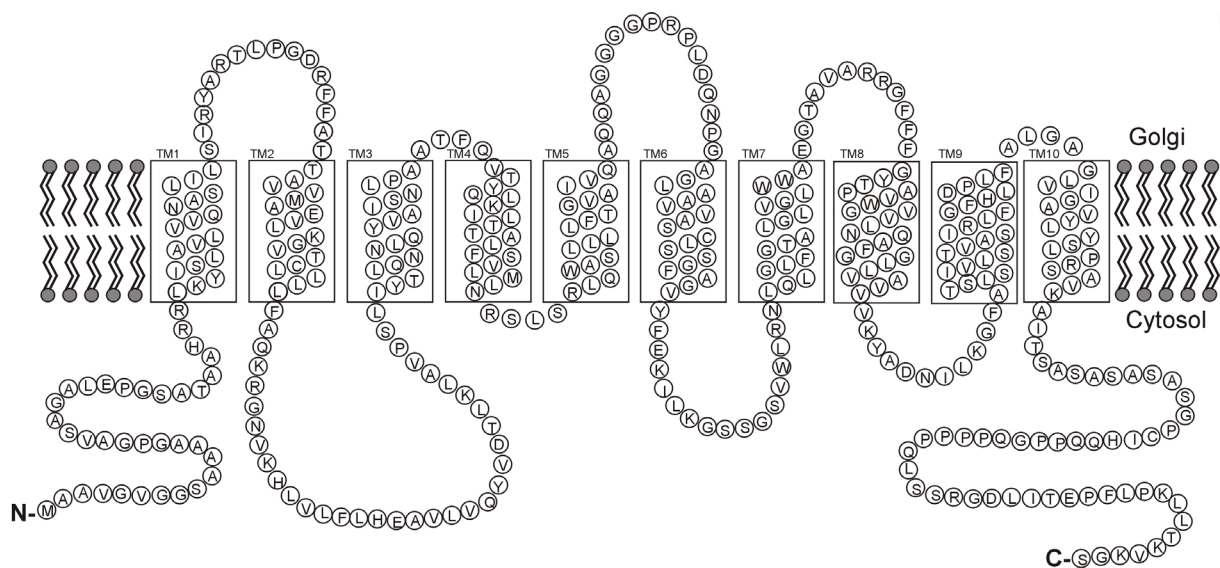


Abbildung 5: Membrantopologie-Modell des Hamster UGT nach Strukturvorhersage mit PredictTopology (Rost *et al.*, 1995). Das Modell zeigt zehn Transmembrandomänen, wobei der N- und C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Golgi-Membran lokalisiert ist.

5.4. Nachweis der Expression des Hamster UGT

Um nachzuweisen, dass die isolierte cDNA die Translation eines stabilen Proteins erlaubt, wurde das Gen in COS-7-Zellen transfiziert und im Western Blot analysiert. Antikörper gegen den UGT waren nicht verfügbar. Um das Protein im Western Blot detektieren zu können, mussten zusätzliche Epitopsequenzen eingefügt werden. Dazu wurde die cDNA des Hamster UGT durch PCR mit den Oligonukleotiden SO18 und SO19 bzw. SO23 und SO24 amplifiziert und dabei mit Restriktionsschnittstellen versehen (siehe 4.2.3.17.). Die PCR-Produkte wurden nach Verdau mit den Endonukleasen *Bam*HI oder *Eco*RI/*Xba*I (siehe 4.2.3.11.) in die Vektoren pcDNA3-FLAG bzw. pEVRF0-HA ligiert (siehe 4.2.3.14.). Die so entstandenen Konstrukte pcDNA3-FLAG-SO1 und pEVRF0-HA-SO1 ermöglichten die Expression des Hamster UGT als Fusionsprotein mit einem N-terminalen FLAG- bzw. C-terminalen HA-Epitop. Beide Konstrukte wurden transient in COS-7-Zellen transfiziert (siehe 4.2.1.6.). 48-72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat in der SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.2.2.2.). In der Western Blot Analyse mit dem anti-FLAG- bzw. anti-HA- als primären Antikörper konnte ein Protein mit einer Größe von etwa 42 kDa detektiert werden (siehe 4.2.2.4.). Dies stimmte gut mit dem berechneten Molekulargewicht für den Hamster UGT von 41,5 kDa überein.

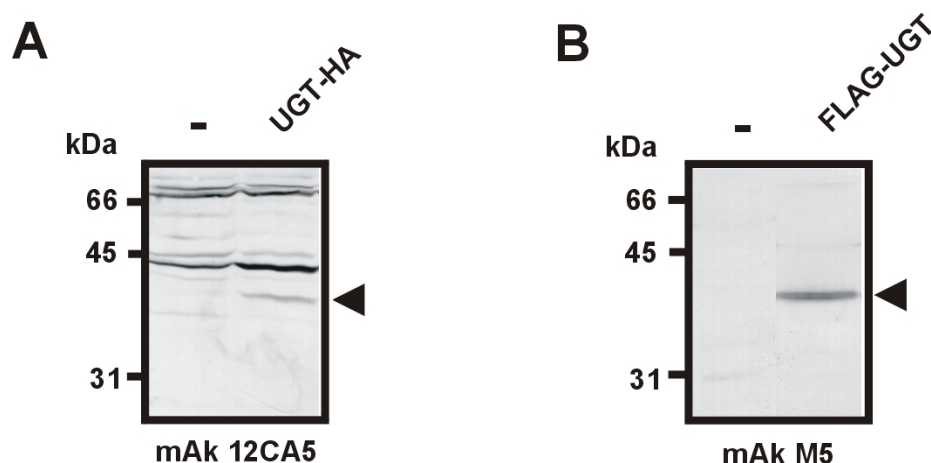


Abbildung 6: Nachweis der Expression des Hamster UGT über die Darstellung epitopmarkierter Formen des Hamster UGT nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen. Entwicklung des Western Blots mit anti-HA- bzw. anti-FLAG- als primäre Antikörper, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP. A: Darstellung des HA-Fusionsproteins, B: Darstellung des FLAG-Fusionsproteins im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (-).

5.5. Nachweis der Aktivität des Hamster UGT

Um die funktionelle Aktivität des isolierten Gens nachzuweisen, wurde der Hamster UGT transient in den für dieses Gen defekten Zellen der Komplementationsgruppe Lec8 exprimiert.

Wildtyp CHO-Zellen (die parentalen Zellen der Komplementationsgruppe Lec8), exprimieren auf ihrer Oberfläche das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) mit einer besonderen terminalen Modifikation ihrer Glykanstruktur, der Polysialinsäure (PSA). PSA ist ein Homopolymer aus α -2,8-verknüpften Sialinsäureresten. PSA-Expression kann über einen spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) 735 detektiert werden (Frosch *et al.*, 1985). Ist PSA auf den CHO-Zellen nachweisbar, so zeigt dies, dass alle Faktoren zur Bildung dieser komplexen N-Glykanstruktur funktionell aktiv sind. Lec8-Zellen zeigen keine PSA-Expression, da sie einen Defekt im UGT besitzen und deshalb nicht galaktosylieren können. Durch das Fehlen der Galactose ist auch die Sialylierung blockiert, denn in der Mehrzahl der komplexen Strukturen wird die Sialinsäure auf Galactose übertragen. Die Blockade der Sialylierung wiederum bedingt die Verhinderung der PSA-Expression. Durch Transfektion des funktionell aktiven Transporters konnte die PSA-Expression wieder hergestellt werden und über den spezifischen Antikörper mAk 735 detektiert werden. 48-72 Stunden nach transients Transfektion (siehe 4.2.1.6.) in Lec8-Zellen wurde die Fähigkeit der UGT-Fusionsproteine, Lec8-Zellen zum Wildtyp zu ergänzen, über die Rekonstitution der PSA-Expression nachgewiesen.

In der immunocytochemischen Darstellung (siehe 4.2.1.7.) waren nach der Entwicklung mit dem PSA-spezifischen Antikörper mAk 735 deutlich rot-violette Zellen zu sehen.

Für die Analyse im Western Blot (siehe 4.2.2.3.) wurden die Lec8-Zellen 48-72 Stunden nach Transfektion lysiert und das Lysat in der SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.2.2.2.). Als Kontrolle wurden auch Lec2-Zellen (Subklon 6B2), die einen Defekt im CST besitzen, mit der UGT-cDNA transfiziert. Ein Teil der Lysate wurde mit Endoneuraminidase NE (Endo NE; (Finne und Makela, 1985; Gerardy-Schahn *et al.*, 1995) inkubiert. Endo NE hydrolysiert spezifisch α -2,8-verknüpfte Sialinsäurereste ab einer Kettenlänge von 8 Resten und zerstört damit das Epitop für den PSA-spezifischen mAk 735. Nach Entwicklung mit dem mAk 735 wurde sowohl bei den CHO-Zellen (Abbildung 7, CHO K1) als auch bei den mit den verschiedenen UGT-Konstrukten transfizierten Lec8-Zellen ein charakteristisches,

mikroheterogenes PSA-Signal erhalten, welches die polysialylierte Form des NCAMs darstellte. Die Transfektion eines Hamster UGT-Konstrukts in 6B2-Zellen (CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 mit einem Defekt im CMP-Sialinsäure Transporter; Eckhardt *et al.*, 1998) führte aufgrund der anderen Substratspezifität des Transporters nicht zu einer Korrektur des Defekts in Lec2-Zellen. Die Spezifität des PSA-Signals wurde durch Verdau mit Endo NE bestätigt. Der isolierte Hamster UGT war also in der Lage, den Defekt der Lec8-Zellen zu korrigieren und besaß damit eindeutig funktionelle UDP-Galactose Transportaktivität. Da die Intensität der erhaltenen PSA-Signale für unmarkierte (Abbildung 7: UGT wt) und epitopmarkierte UGT-Konstrukte (Abbildung 7: FLAG-UGT, UGT-HA) vergleichbar war, hat das Anhängen von Epitopen an beide Enden offensichtlich keinen Einfluss auf die Aktivität des Transporters.

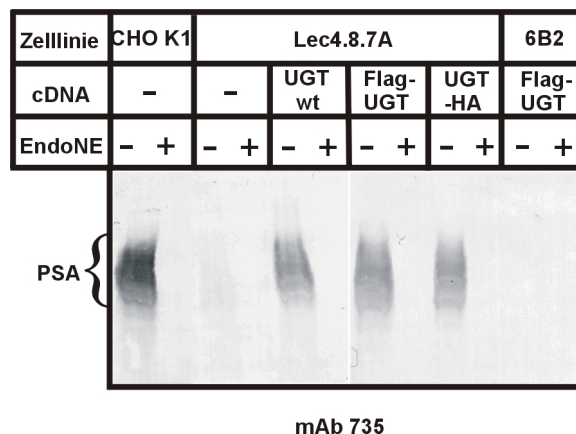


Abbildung 7: Nachweis funktioneller Aktivität des Hamster UGT durch Komplementation des lec8-Defekts. Darstellung der Komplementation anhand der Reexpression von PSA nach transienter Transfektion verschiedener Hamster UGT-Konstrukte ohne (UGT-wt) und mit Epitop (FLAG-UGT, UGT-HA). Entwicklung des Western Blots mit anti-PSA-Antikörper 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP. CHO K1-Zellen zeigten als Positivkontrolle endogene PSA-Expression, ebenso alle Lec8-Zellen nach Transfektion der UGT-Konstrukte. 6B2- sind CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 mit einem Defekt im CMP-Sialinsäure Transporter (Eckhardt *et al.*, 1998). Transfektion von Hamster UGT führte aufgrund der Substratspezifität des Transporters nicht zu einer Korrektur des Defekts in Lec2 Zellen.

5.6. Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Hamster UGT

Nachdem die Aktivität des isolierten Hamster UGT nachgewiesen war, stellte sich die Frage nach der subzellulären Lokalisation des Transporters in der Zelle. Wegen der im Golgi-Apparat stattfindenden Galactosylierung wurde eine Lokalisation im Golgi-Apparat vorhergesagt. Der Nachweis einer UDP-Galactose Transportaktivität in Fraktionen des Golgi-Apparats bestätigte diese Lokalisation (Sommers und Hirschberg, 1982). Darüber hinaus wurde sowohl für den humanen (Yoshioka *et al.*, 1997) als auch für den Maus UGT (Ishida *et al.*, 1999a) in Immunfluoreszenzstudien eine Lokalisation im Golgi-Apparat nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Lokalisation des Hamster UGT in der Zelle wurden die unter 5.4. beschriebenen UGT-Konstrukte transient in CHO-Zellen transfiziert. Wegen ihrer mit flachen, langgestreckten Zellen anschaulichen Morphologie wurde die Zelllinie 6B2 aus der CHO Komplementationsgruppe Lec2 (Eckhardt *et al.*, 1998) verwendet. 24-48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem anti-FLAG bzw. dem anti-HA Antikörper entwickelt (siehe 4.2.1.8.). Als Referenzfärbung für den Golgi-Apparat wurde ein polyklonales Serum gegen die α -Mannosidase II, ein im Golgi-Apparat lokalisiertes Enzym, verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden Cy3- bzw. Alexa 488-konjugierte Antikörper verwendet, die im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Die Fluoreszenzsignale der untersuchten Hamster UGT-Fusionsproteine co-lokalisierten eindeutig mit denen der α -Mannosidase II (Abbildung 8) und bestätigten die subzelluläre Lokalisation des Transporters im Golgi-Apparat.

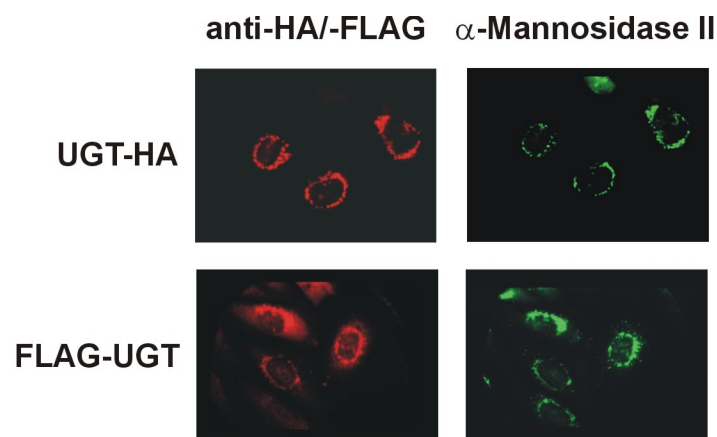


Abbildung 8: Darstellung der Fusionsproteine A: UGT-HA und B: FLAG-UGT über indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Entwicklung mit dem anti-FLAG- bzw. dem anti-HA-Antikörper und einem polyklonales Serum gegen α -Mannosidase II. Als sekundäre wurden Cy3- bzw. Alexa 488-konjugierte Antikörper verwendet.

5.7. Nachweis von Hamster UGT mRNA im Northern Blot

Um die Expression des Hamster UGT auf mRNA-Ebene darzustellen wurden CHO-Zellen im Northern Blot (siehe 4.2.3.22.) analysiert. mRNA isoliert aus CHO-Zellen wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die mRNA auf der Membran wurde mit einer Digoxigenin-markierten Sonde vom 5'-Ende (Nukleotide 32–503) des Hamster UGT hybridisiert (siehe 4.2.3.27.) und anschließend mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper entwickelt. In CHO-Zellen waren zwei Hybridisierungssignale der Größe 2,4 kb und 1,4 kb darstellbar (Abbildung 9).

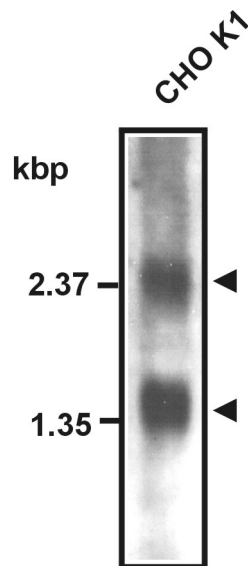


Abbildung 9: Northern Blot Analyse von mRNA aus CHO-Zellen. Die mRNA wurde nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde abgeleitet vom 5'-Ende des Hamster UGT hybridisiert und mit einem anti-Digoxigenin Antikörper entwickelt.

5.8. 5'-RACE und Bestimmung des potentiellen Transkriptionsstarts

In der Northern Blot Analyse des Hamster UGT wurden zwei Hybridisierungssignale erhalten. Da vom 5'-UTR bisher nur wenige Basenpaare bekannt waren, sollte die Existenz eines möglichen zweiten Transkriptionsstarts im 5'-Bereich durch eine 5'-RACE (siehe 4.2.3.25.) untersucht werden. Dazu wurde UGT mRNA mit Hilfe des spezifischen Oligonukleotids SO6 revers transkribiert mit einem Poly(A)-Schwanz versehen. In der anschließenden PCR wurde die Sequenz zwischen dem Poly(A)-Schwanz und dem offenen Leseraster mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Trotz wiederholter Ansätze konnte nur in einem einzigen Versuch eine Sequenz von insgesamt 304 bp vor dem Start-ATG gewonnen werden (Abbildung 10). Bei Position -304 könnte es sich um den Transkriptionsstart des Gens handeln. Weitere Methoden sind aber notwendig, um dieses Ergebnis zu verifizieren. Es wurde kein weiteres Start-ATG gefunden. In dem erhaltenen 5'-Bereich konnte keine TATA-Box identifiziert werden.

```

-304 GACAGTCGGGGTCGGTGAGGCCGGCAGGGAGGTGTGGGCCGGGTCTGCTGCCACGTTGTGCCAGCAGAG -236
-235 AAGTGTAAGGACTGTGGCGCTCTTGGTCTCTCAGGTTTTGGTGAAATTTGGGAAGCTCGAAACCACCAT -167
-166 TTAGAATCGGGGTTGGAAAAAATCGGGTTTGGAACGGGCTAAGAACACCCACCTCCCCGTCCCAGCT -98
-97 TAATCGTCCGCCACCACTCCGGAGGCCCGGAAGCGGACGTGATGGATACGGAAGTAGCCTGCTGTTGC -29
-28 CGAGGGGACGGAACGGGCAGATGCCAACATG 3

```

Abbildung 10: Der 5' untranslatierte Bereich des Hamster UGT als Ergebnis der 5' RACE. Das Start-ATG ist fett gedruckt.

5.9. Analyse der Komplementationsgruppe Lec8

Die Komplementationsgruppe Lec8 umfasst CHO-Zelllinien, die einen Defekt im UGT-Gen besitzen. Auf der Basis der erhaltenen Sequenzinformation konnte der Versuch unternommen werden, die molekularen Ursachen zu untersuchen, die in den Klonen der Komplementationsgruppe Lec8 zum Funktionsverlust führen. Neben einem kommerziell erwerblichen Klon (Lec8, ATCC CRL 1737) standen im Rahmen einer Kooperation mit Prof. P. Stanley, Albert Einstein College of Medicine in New York, USA, acht weitere unabhängige Klone für die Analyse zur Verfügung (Tabelle 2). Wie aus den Klonbezeichnungen ersichtlich ist, handelte es sich in allen Fällen um Mehrfachmutanten.

Systematischer Name	Verkürzter Name	Referenz
Pro⁻5Lec8.5H	Lec8.5H	(Stanley, 1983)
Gat⁻2Lec8.1C	Lec8.1C	(Stanley, 1983)
Gat⁻2Lec8.2B	Lec8.2B	(Stanley, 1983)
Pro⁻5Lec4.Lec8	Lec4.8.7A	(Stanley, 1989)
Pro⁻5Lec4A.Lec8	Lec4A.Lec8	(Stanley, 1989)
Pro⁻5Lec3.2.8	Lec3.2.8	(Stanley, 1989)
Pro⁻5Lec3.2.8.1	Lec3.2.8.1	(Stanley, 1989)
Pro⁻5LEC10.Lec8	LEC10.Lec8	(Stanley <i>et al.</i>, 1991)

Tabelle 2: Zusammenfassung aller von Prof. P. Stanley zur Verfügung gestellten Klone der Komplementationsgruppe Lec8.

5.9.1. Northern Blot Analyse der Komplementationsgruppe Lec8

Die Northern Blot Analyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Klone eine stabile UGT mRNA exprimieren. Die Gegenwart einer stabilen mRNA macht es sehr wahrscheinlich, dass der Funktionsverlust im UGT auf einen Defekt in den proteincodierenden Abschnitten des Gens zurückgeht. Wird keine stabile mRNA gefunden, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass regulatorische Sequenzen betroffen sind.

Die Northern Blot Analyse wurde wie unter 4.2.3.22. und 5.7 beschrieben durchgeführt. Für den Wildtyp wurden wieder die beiden Hybridisierungssignale der Größe 2,4 kb und 1,4 kb erhalten (Abbildung 11). Ein entsprechendes Signal wurde für drei der neun untersuchten Klone (Lec8.5H, Lec8.1C, LEC10.Lec8) erhalten. Für Klon Lec8 war ein etwas kleineres Signal von etwa 2,3 kb zu beobachten. Klone Lec8.2B, Lec3.2.8, Lec3.2.8.1, Lec4.8.7A und Lec4A.Lec8 zeigten kein Signal. Die Anwesenheit von mRNA wurde durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten GAPDH-Sonde kontrolliert. (Abbildung 11).

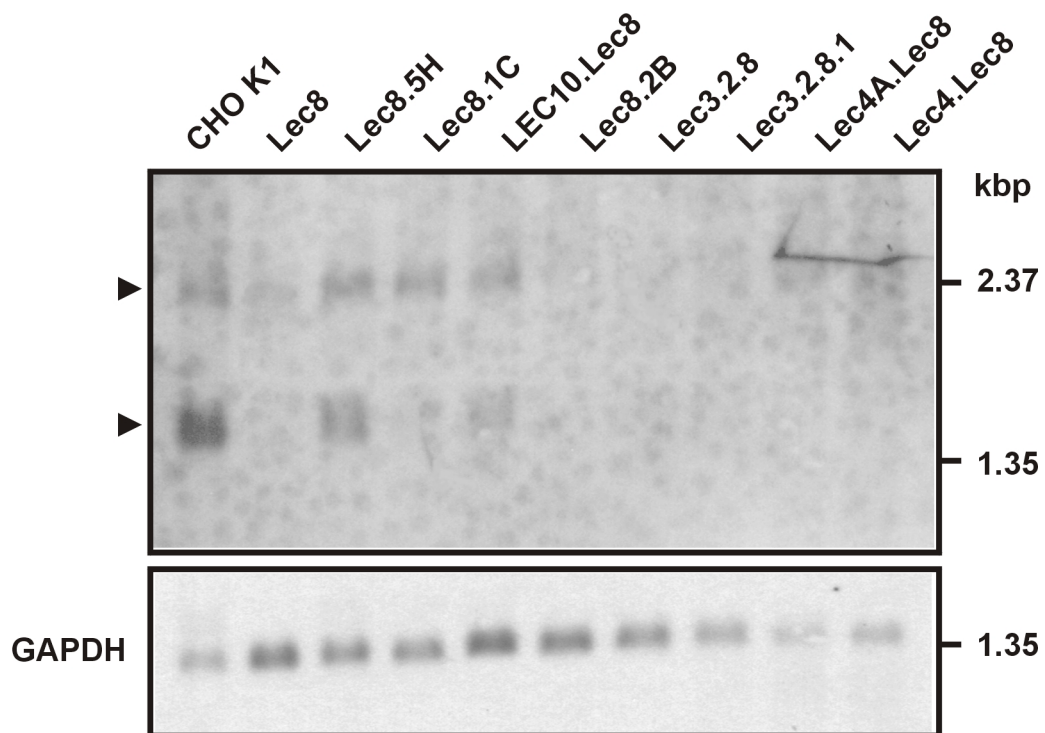


Abbildung 11: Northern Blot Analyse von neun unabhängigen Lec8-Klonen. Die mRNAs auf der Nylonmembran wurden mit einer Digoxigenin-markierten Sonde vom 5'-Ende des Hamster UGT hybridisiert. Die Anwesenheit von mRNA wurde durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten GAPDH-Sonde kontrolliert.

5.9.2. Untersuchung der Komplementationsgruppe Lec8 über RT-PCR

Möglicherweise waren bei einigen untersuchten Lec8-Klonen regulatorische Abschnitte betroffen oder Mutationen im UGT-Gen aufgetreten, die die Halblebenszeit der mRNA stark verkürzten. Die Expression der mRNAs kann dadurch so weit absinken, dass in der Northern Blot Analyse, wie in einigen Fällen beobachtet, kein Signal mehr detektierbar ist. Mit Hilfe der RT-PCR, einer sensitiven Methode zur Erfassung weniger Transkripte wurde das Fehlen spezifischer UGT mRNA in den oben beschriebenen Klonen kontrolliert.

Für die RT-PCR wurde isolierte mRNA eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des spezifischen Oligonukleotids SO47, die Amplifikation der spezifischen cDNAs über „nested“ PCR mit den Oligonukleotidpaaren SO45/SO46 und SO48/SO11 (siehe 4.2.3.24.). Im Wildtyp sowie in den drei Klonen mit einem entsprechenden Signal im Northern Blot (Lec8.5H, Lec8.1C, LEC10.Lec8) wurde eine DNA-Bande der erwarteten Größe von 1,2 kb erhalten (Abbildung 12). RT-PCR von Klon Lec8 ergab eine etwas kleinere DNA-Bande entsprechend dem Ergebnis in

der Northern Blot Analyse. Für alle anderen Klone (Lec8.2B, Lec3.2.8, Lec 3.2.8.1, Lec4.8.7A und Lec4A.Lec8) wurden verschiedene kleine DNA-Banden erhalten (Abbildung 12).

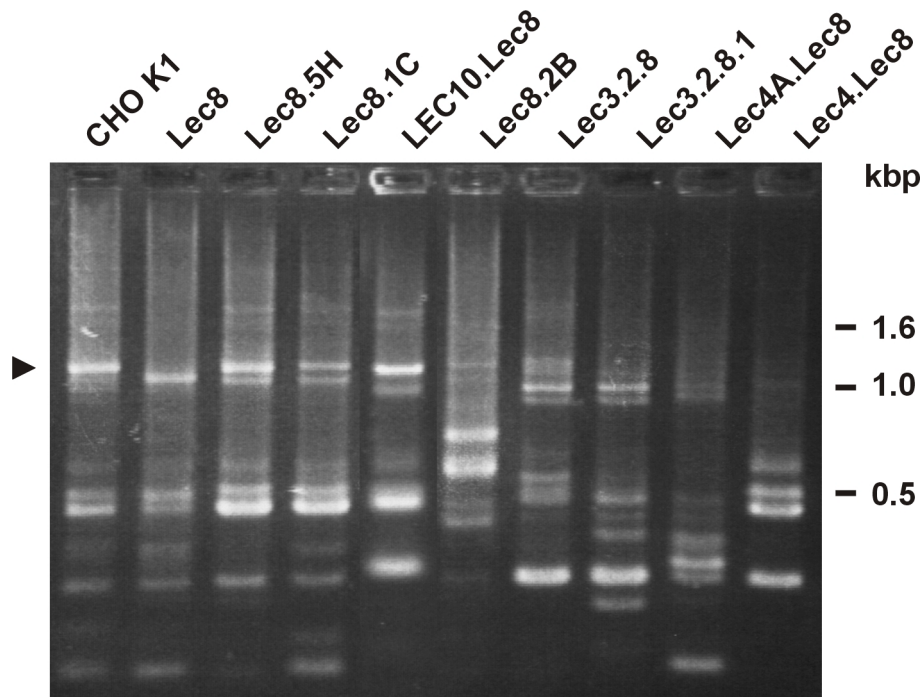


Abbildung 12: RT-PCR von neun unabhängigen Lec8 Klonen. Die mRNAs wurden mit Oligonukleotid SO47 revers transkribiert und die cDNAs wurden nacheinander mit Oligonukleotiden SO45 und SO46 bzw. SO48 und SO11 durch PCR amplifiziert (siehe 4.2.3.17.).

Alle großen und zahlreiche kleine DNA-Fragmente wurden aus dem Gel aufgereinigt und in den Vektor pGEM-T subkloniert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend sequenziert. Um PCR-Artefakte und Sequenzierfehler auszuschließen wurde die RT-PCR und alle folgenden Schritte bis zur Sequenzierung mehrfach durchgeführt. Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte ergab für Klon Lec8 eine Deletion von Nukleotid 275 bis 374, was zu einer Verschiebung im Leseraster und damit zu einem vorzeitigen Stop nach der neu eingeführten Aminosäure Glutaminsäure in Position 92 führte. In Klon Lec8.5H wurde der Verlust eines Basentriplets (Nukleotide 636-638) identifiziert, der auf Proteinebene zur Deletion eines Serins in Position 213 führte. In Klon Lec8.1C führte die Punktmutation G844A zu einem Austausch von Glycin zu Asparaginsäure in Position 281. In Klon LEC10.Lec8 führte die Punktmutation T364C zu einem Austausch von Tyrosin zu Histidin in Position 122. Identifizierte Mutationen sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt. Bei den kleineren RT-PCR Produkten der übrigen Klone handelte es sich um Hamster UGT-

Sequenzen mit verschiedenen großen Deletionen. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung der Northern Blot Analyse, dass bei diesen Klonen keine stabile mRNA gebildet wird. Die weitere Analyse dieser Klone war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zelllinie	Nukleotid-defekt	Veränderte Aminosäure	Protein-expression	Transport-aktivität	Lokalisation
Wildtyp	-	-	+	+	Golgi
Lec8	$\Delta 275-374$	E92stop	+	-	ER
Lec8.5H	$\Delta 636-638$	$\Delta S213$	+	-	Golgi
Lec8.1C	G844A	G281D	+	-	Golgi
LEC10.Lec8	T364C	Y122H	+	+	Golgi

Tabelle 3: Zusammenfassende Darstellung der gefundenen molekularen Defekte in verschiedenen Lec8-Klonen.

5.9.3. Konservierung der in Lec8-Klonen gefundenen Punktmutationen

Alle gefundenen Punktmutationen sind in potentiellen Transmembranbereichen des Hamster UGT lokalisiert (Abbildung 13).

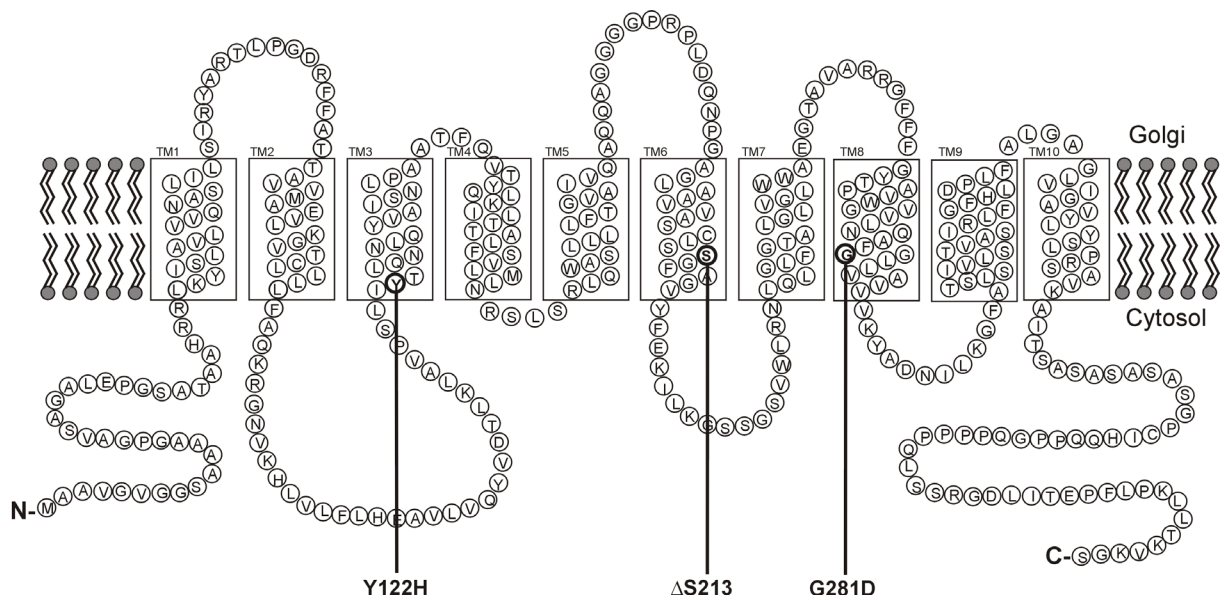


Abbildung 13: Membrantopologie-Modell des Hamster UGT und Lokalisation der in Lec8-Klonen gefundenen Punktmutanten

Die betroffenen Aminosäuren sind Teil hoch konservierter Sequenzen in der Familie der Zucker-Nukleotid Transporter (Abbildung 14). Die beiden Transporter aus der Hefe *S. cerevisiae* zeigten eine Konservierung in den ersten beiden Sequenzabschnitten, die Transporter aus der Hefe *K. lactis* und aus *L. donovanii* zeigten keine Konservierung. Die ansonsten hohe Konservierung dieser Sequenzmotive weist darauf hin, dass diese Abschnitte für die Architektur der Transporter bzw. den aktiven Vorgang des Transports notwendig sind. Die Untersuchung äquivalenter Mutationen in anderen Zucker-Nukleotid Transporter müsste demnach zu entsprechenden Ergebnissen führen. Unter dieser Maßgabe wurden alle nachfolgenden Untersuchungen parallel mit dem im Labor verfügbaren Maus CST durchgeführt.

		Y122H		ΔS213		G281D
Hamster UGT	(117)	VPSLIYTLQNN	(208)	ASCLSSGFAGV	(276)	LNQAFGGLLVA
Humaner UGT1/2	(117)	VPSLIYTLQNN	(208)	ASCLSSGFAGV	(276)	LNQAFGGLLVA
Muriner UGT	(117)	VPSLIYTLQNN	(208)	ASCLSSGFAGV	(276)	LNQAFGGLLVA
Humaner UGlcNAcT	(089)	IPSGIYTLQNN	(181)	TACFSSGFAGV	(249)	VLQALGGLVIA
Hunde UGlcNAcT	(089)	IPSGIYTLQNN	(182)	TACFSSGFAGV	(250)	ILQALGGLVIA
Humaner CST	(093)	VPSLVYAVQNN	(183)	IAVLCSGFAGV	(251)	FLASVGGLYTS
Hamster CST	(093)	VPSLVYAVQNN	(183)	IAVLCSGFAGV	(251)	FLASVGGLYTS
Muriner CST	(093)	VPSLVYAVQNN	(183)	IAVLCSGFAGV	(251)	FLASVGGLYTS
<i>S. pombe</i> UGT	(100)	IPAFLYTLQNN	(192)	VACLISGLAGV	(260)	LLQAGGGLIIVA
<i>S. cerevisiae</i> GMT	(095)	LVLMIYTS SKA	(190)	TNCITSSALFUL	(256)	IISGVASVGVIS
<i>S. cerevisiae</i> UGlcNAcT	(076)	TVVLFYISSTT	(180)	LSSFTSSLLSA	(253)	ETLLLFNVLVTQ
<i>K. lactis</i> UGlcNAcT	(075)	AVFLFFTSSVA	(175)	VATALMSLLSL	(247)	LFMLIANNVITQ
<i>L. donovanii</i> GMT	(084)	FVAMLFTSMKS	(161)	LNIVSTVSYTL	(229)	-FSVLVSSVMT

Abbildung 14: Die *lec8*-Mutationen betreffen Sequenzabschnitte, die in allen Zucker-Nukleotid Transportern aus Säugetierspezies hoch konserviert sind. Die mutiert gefundenen Aminosäuren sind schwarz unterlegt bzw. im Fall der Transporter aus *S. cerevisiae* in einem Kasten dargestellt. UGT: UDP-Galactose Transporter, UGlcNAcT: UDP-N-Acetylglucosamin Transporter, CST: CMP-Sialinsäure Transporter, GMT: GDP-Mannose Transporter

5.9.4. Herstellung und Nachweis der Expression *lec8*-mutierter Sequenzen des Hamster UGT und des Maus CST

Um die Bedeutung der gefundenen Punktmutationen näher zu untersuchen, wurden Austausche in FLAG- oder HA-Fusionsproteine des Hamster UGT und des Maus CST eingeführt. Translationsprodukte der einzelnen Konstrukte wurden nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen nachgewiesen. Dazu wurden, wie für die Wildtypen gezeigt (siehe 5.4.), die Zellen 48-72 Stunden nach Transfektion lysiert und das Lysat in der SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western Blot Analyse mit den

entsprechenden anti-FLAG- bzw. anti-HA-Antikörpern, AP-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper und Farbreaktion mit NBT/BCIP konnte in allen Fällen ein Protein erwarteter Größe detektiert werden (Abbildung 15). Alle Punktmutationskonstrukte, auch im CST, wurden stabil exprimiert.

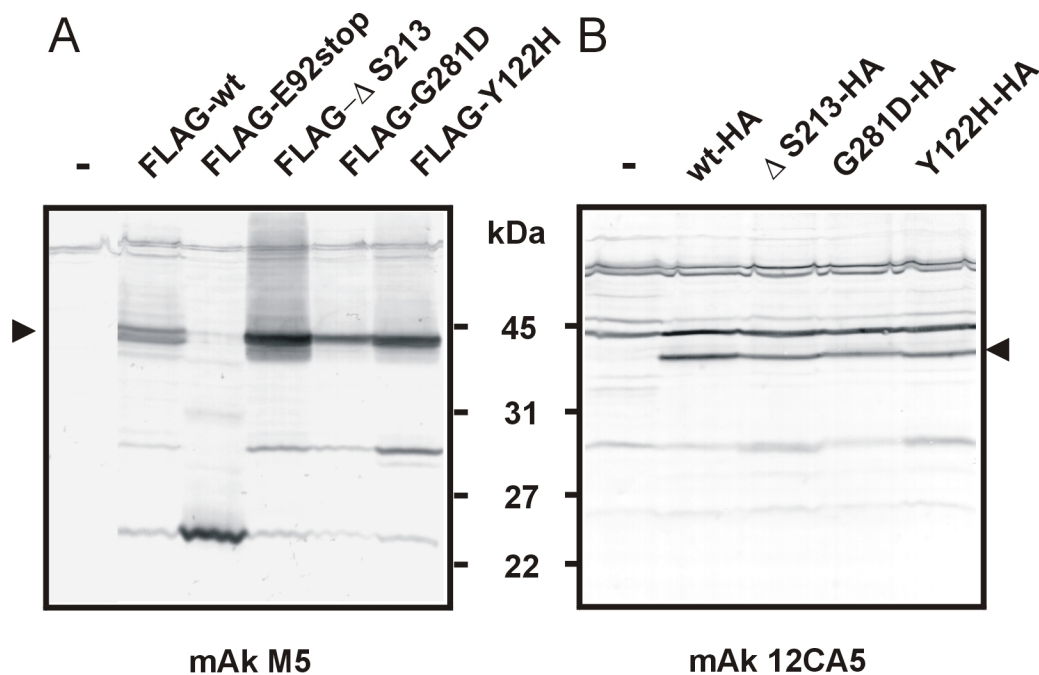


Abbildung 15: Nachweis der Proteinexpression der Punktmutationskonstrukte als UGT-Fusionsprotein mit A: N-terminalem FLAG-Epitop und B: C-terminalem HA-Epitop. In A ist darüber hinaus das Produkt der *lec8*-Mutation mit dem vorzeitigen Stop nach Glutaminsäure 92 zu sehen. Entwicklung des Western Blots mit A: anti-FLAG- bzw. B: anti-HA-Antikörper, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

5.9.5. Bestimmung der subzellulären Lokalisation von *lec8*-mutierten Fusionsproteinen des Hamster UGT und des Maus CST

Die Bestimmung der Lokalisation der Hamster UDP-Galactose bzw. der Maus CMP-Sialinsäure Punktmutationskonstrukte in der Zelle wurde, wie zuvor für die Wildtypen beschrieben (5.6.), durchgeführt. Es zeigte sich eine Co-Lokalisation der Fluoreszenzsignale der mutierten Fusionsproteine mit denen für α -Mannosidase II, was für eine Lokalisation der Punktmutationskonstrukte im Golgi-Apparat spricht (Abbildung 16). Das Fusionsprotein von Klon Lec8 mit dem vorzeitigen Stop (E92Stop)

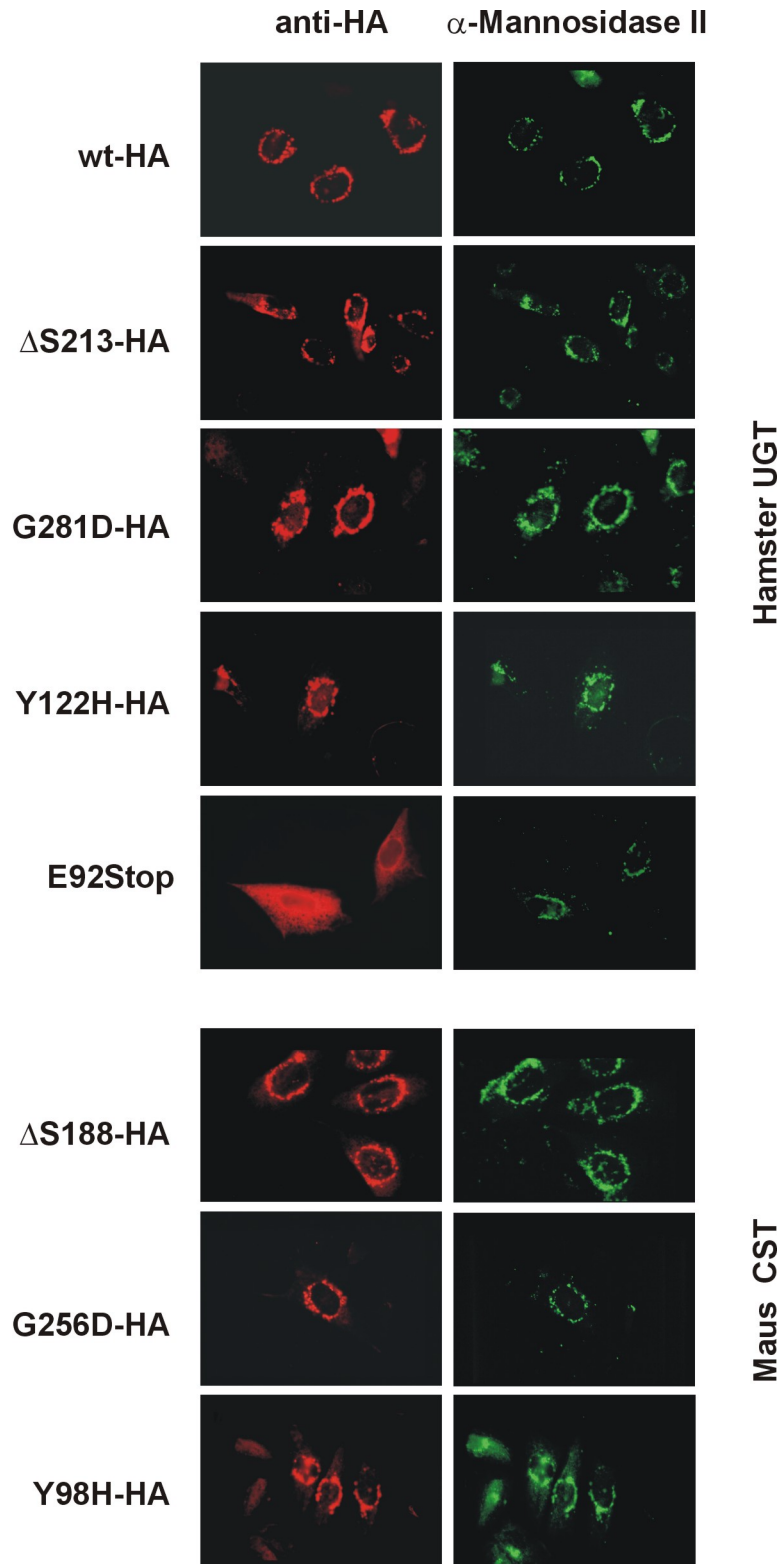


Abbildung 16: Darstellung *lec8*-mutierter Formen des Hamster UDP-Galactose und Maus CST Fusionsproteins über indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Entwicklung mit dem anti-HA Antikörper und einem polyklonalen Serum gegen α -Mannosidase II. Als sekundäre wurden Cy3 bzw. Alexa 488 konjugierte Antikörper verwendet.

5.9.6. Nachweis funktioneller Aktivität von *lec8*-mutierten Fusionsproteinen des Hamster UGT und des Maus CST

Die Bestimmung der funktionellen Aktivität der mutierten Fusionsproteine des Hamster UGT bzw. des Maus CST wurde, wie zuvor für die Wildtypkonstrukte beschrieben (5.5.), durchgeführt. Für die Mutation Tyrosin zu Histidin (Position 122 im Hamster UGT, Position 98 im Maus CST) zeigte sich ein deutliches PSA-Signal und damit eindeutig Transportaktivität (Abbildung 17). Dies war überraschend, da diese Punktmutante aus einer UGT-negativen Zelle LEC10.Lec8 isoliert worden war.

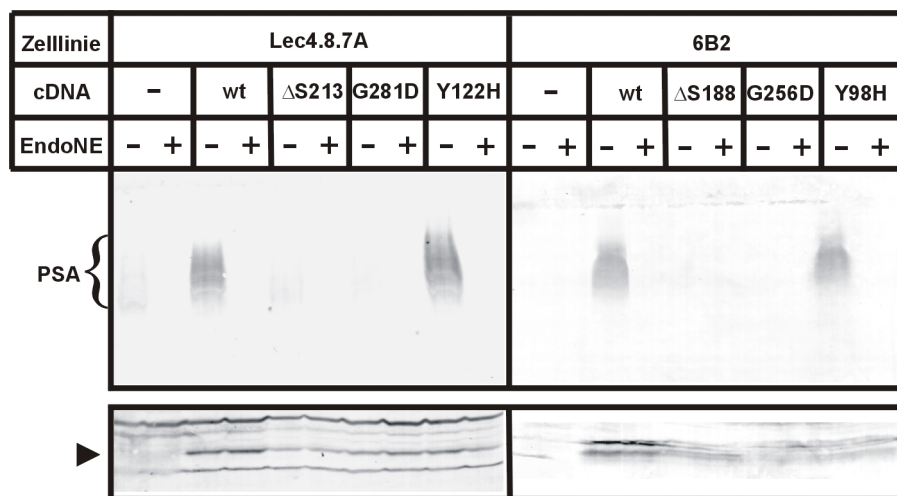


Abbildung 17: Nachweis funktioneller Aktivität der *lec8*-mutierten Fusionsproteine vom Hamster UGT bzw. Maus CST durch Komplementation des *lec8*-(links) bzw. des *lec2*-Defekts (rechts). Nachweis der Komplementation anhand der Reexpression von PSA. Transiente Transfektion der DNA-Konstrukte in Lec8 (Subklon Lec4.8.7A)- und Lec2 (Subklon 6B2)-Zellen. Konstrukte Y122H bzw. Y98H zeigten wie die Positivkontrolle funktionelle Aktivität. Entwicklung des Western Blots mit anti-PSA-Antikörper 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärintikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

Zur Bestätigung der Mutation Tyrosin 122 zu Histidin (Y122H) im Klon LEC10.Lec8 wurde genomische DNA sowohl aus diesen Zellen als auch aus der entsprechenden Parentalzelllinie (LEC10) im Bereich der Mutation durch PCR amplifiziert (4.2.3.17.), subkloniert und sequenziert (4.2.3.28.). Es zeigte sich, dass die Mutation nicht in den LEC10-, wohl aber (wegen der allelischen Verteilung in 50% der analysierten PCR-Produkte) in den LEC10.Lec8-Zellen vorlag. Die Existenz einer stabilen mRNA und die Expression eines stabilen Proteins wurden zuvor bereits nachgewiesen. Um auszuschließen, dass die dominante LEC10-Mutation für den Defekt im Hamster UGT verantwortlich war, wurde die funktionelle Aktivität des Wildtyp- und des

mutierten Proteins nach Transfektion der DNA in die LEC10.Lec8-Zellen bestimmt. Auch vor dem Hintergrund der LEC10-Mutation komplementierte die Punktmutante den *lec8*-Defekt (Abbildung 18). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Mutation *in vivo* ausreicht, um den Hamster UGT zu inaktivieren. Bei einer transienten Transfektion kommt es zu einer Überexpression des transfizierten Proteins. Möglicherweise konnte durch die große Menge an mutiertem Hamster UGT in der transfizierten Zelle der Defekt korrigiert werden.

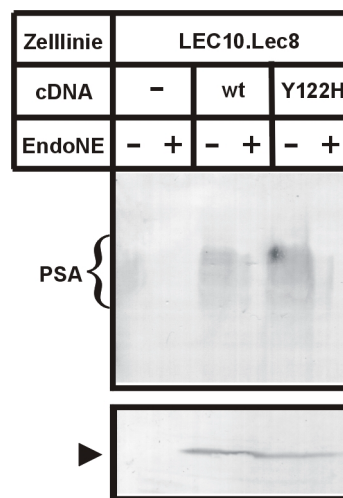


Abbildung 18: Komplementation des *lec8*-Defekts nach transienter Transfektion der Y122H-Mutation in der Zelllinie LEC10.Lec8, in der die Mutation gefunden wurde. Darstellung der Komplementation des *lec8*-Defekts anhand der Reexpression von PSA. Entwicklung des Western Blots mit anti-PSA-Antikörper 735, AP-konjugiertem anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

5.10. Studien zur Qualität der *lec8*-mutierten Aminosäuren

Zur Bestimmung der Qualität der in den Lec8-Klonen mutiert gefundenen Aminosäuren Tyrosin122, Serin213 und Glycin281 wurden sie in UGT-Fusionsproteinen gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht. Ein Austausch von Tyrosin122 gegen Histidin führte im UGT nicht zu einem Aktivitätsverlust (siehe 5.9.6.). Tyrosin122 wurde außerdem gegen Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Glutaminsäure (E), Alanin (A) und Isoleucin (I) ausgetauscht und die entsprechenden Proteine wurden auf ihre Aktivität getestet. Glycin281 wurde gegen Asparaginsäure (D), Alanin und Serin (S) ausgetauscht. Serin 213 wurde gegen Threonin (T), Asparaginsäure und Alanin ausgetauscht. Da die UDP-Galactose- und

UDP-*N*-Acetylglucosamin Transporter ein Serin in der benachbarten Position 212 haben, wurde auch diese Aminosäure im Hamster UGT durch Alanin und Cystein (S212A+S213A und S212C+S213A) ersetzt. Darüber hinaus wurde Alanin zwischen die beiden Serine inseriert (S212+A+S213), um den Einfluss auf die Helixgeometrie, verglichen mit der Deletion von Serin213, zu überprüfen. Parallel wurde das entsprechende Serin im Maus CST in Position 188 durch Alanin (S188A) ausgetauscht. Das Cystein in der Position davor wurde außerdem durch Serin (C187S+S188A) ausgetauscht. Durch ein falsches Oligonukleotidpaar wurde darüber hinaus ein Austausch von Cystein und Serin in Tryptophan und Prolin (C187W+S188P) erzeugt. Alle zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind unter 4.1.6. beschrieben.

Die Konstrukte wurden in der Immuncytochemie (siehe 4.2.1.7.) oder im Western Blot (4.2.2.4.) auf ihre funktionelle Aktivität getestet. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis für die Aminosäureaustausche in Position 122. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Ein Nachweis der Expression der Proteine sowie die Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurde nicht für alle Konstrukte durchgeführt.

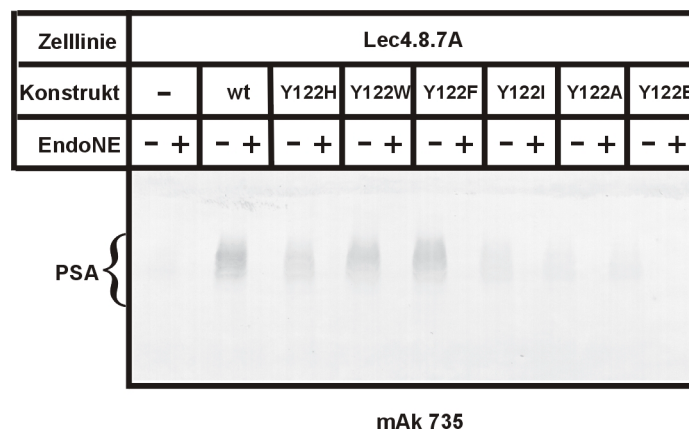


Abbildung 19: Nachweis funktioneller Aktivität von Hamster UGT-Fusionsproteinen mit verschiedenen Aminosäureaustauschen in Position 122. Darstellung der Komplementation des *lec8*-Defekts nach transienter Transfektion in Lec8-Zellen anhand der Reexpression von PSA. Entwicklung des Western Blots mit anti-PSA-Antikörper 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

Konstrukt	Aktivität	Proteinexpression	Lokalisation
Y122H	+	+	Golgi
Y122F	+		
Y122W	+		
Y122I	(+)		
Y122A	-		
Y122E	-		
G281D	-	+	Golgi
G281A	+		
G281S	-		
ΔS213	-	+	Golgi
S213T	+		
S213D	-		
S213A	+	+	Golgi
S212A+S213A	+	+	Golgi
S212C+S213A	+	+	Golgi
S212+A+S213	-	+	Golgi
ΔS188	-	+	Golgi
S188A	+	+	Golgi
C187S+S188A	+	+	Golgi
C187W+S188P	-	+	Golgi

Tabelle 4: Aminosäureaustausche in den in Lec8-Klonen mutiert gefundenen Positionen Tyrosin122, Serin213 und Glycin281 im Hamster UGT (oben) und in der äquivalenten Position Serin188 im Maus CST (unten). (+): schwache Aktivität.

5.11. Auswahl der Rezipientenzelllinie für den Nachweis der UGT-Aktivität

Insgesamt wurden neun unabhängige Lec8-Zellklone auf ihre molekularen Defekte untersucht (siehe 5.9.). Alle diese Zelllinien standen auch zur Verfügung, um die Komplementation des *lec8*-Defekts nach transienter Transfektion anhand der Reexpression von PSA zu überprüfen. Um zu untersuchen, welche Zelllinie sich durch gute Transfizierbarkeit und ein gutes Signal-/Hintergrundverhältnis besonders eignete, wurde UGT wt-DNA in verschiedene Lec8-Zelllinien transfiziert und wie oben beschrieben analysiert (siehe 5.5.). Als Positivkontrolle wurden wieder CHO K1-Zellen mitgeführt (Vgl. Abbildung 7).

Bei Zelllinie Lec4.8.7A war ein starkes PSA-Signal bei einem relativ geringen Hintergrund bei den untransfizierten Zellen zu beobachten. Bei Zelllinie Lec8 war ein schwaches Signal nach Transfektion der UGT Wildtyp-DNA zu beobachten, Zelllinien Lec3.2.8 und Lec3.2.8.1 zeigten überhaupt kein Signal (Abbildung 20). Diese Zellen ließen sich möglicherweise nur schlecht transfizieren und kamen deshalb für die Aktivitätsbestimmungen nicht in Frage. Zelllinie Lec4A.Lec8 war ebenfalls nicht geeignet, da sie einen starken Hintergrund bei den untransfizierten Zellen zeigten (Abbildung 20). Alle in der vorliegenden Arbeit gezeigten Versuche zum Nachweis von UGT-Aktivität wurden aufgrund dieses Ergebnisses mit der Zelllinie Lec4.8.7A durchgeführt.

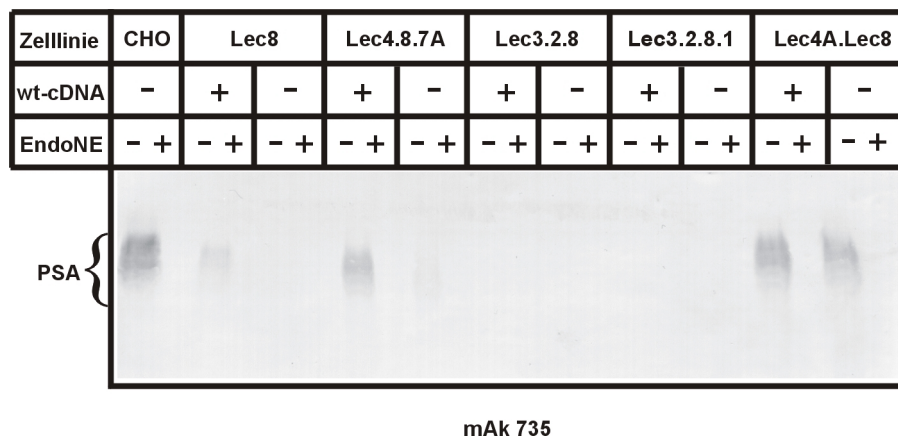


Abbildung 20: Darstellung der Komplementation des *lec8* Defekts anhand der Reexpression von PSA nach transients Transfektion von UGT Wildtyp-DNA in verschiedene Lec8-Klone (Lec8, Lec4.8.7A, Lec3.2.8, Lec3.2.8.1, Lec4A.Lec8). Entwicklung des Western Blots mit anti-PSA-Antikörper 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

5.12. Genomische Organisation des UGT

Sequenzierung der zahlreichen kleinen DNA-Fragmente nach RT-PCR (4.2.3.24.) ergab, dass die Deletionen häufig an gleichen Stellen innerhalb der cDNA begannen und endeten. Unter der Maßgabe, dass es sich dabei um Produkte falsch prozessierter („gesplicer“) mRNA handelte, war dies ein Hinweis darauf, dass es sich dabei um potentielle Intron/Exon-Grenzen des Hamster UGT Gens handelte. Vom humanen UGT waren bereits zwei Exons („E10k“ und „E2.7k“; Miura *et al.*, 1996) mit einem anschließenden großen Intron im Fall von „E10k“ bekannt. Durch eine PCR (siehe 4.2.3.17.) mit genomischer DNA und spezifischen 5' und 3' der

potentiellen Intron/Exon-Grenzen hybridisierenden Oligonukleotiden konnten fast alle Übergänge amplifiziert werden. Die gefundenen Intron/Exon-Grenzen stimmten mit den bekannten Grenzen des humanen UGT überein. Eine Intron/Exon-Grenze des vermutlich großen Introns zwischen Nukleotid 274 und 275 der Hamster UGT-cDNA konnte durch die PCR nicht dargestellt werden. Eine weitere Intron/Exon-Grenze entsprach nicht dem Konsensusmotiv (Padgett *et al.*, 1986; Tabelle 5). Möglicherweise handelte es sich dabei um einen Fehler bei der PCR.

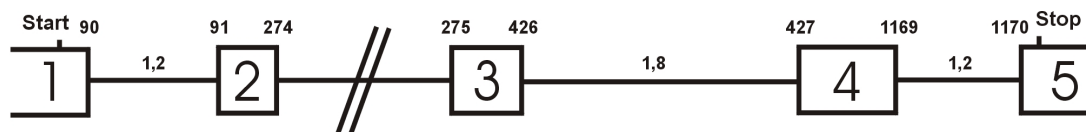


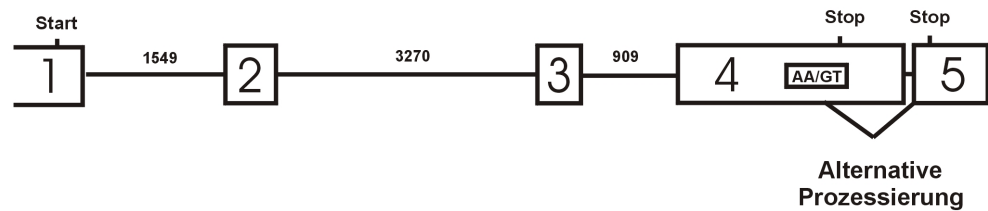
Abbildung 21: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des Hamster UGT bestimmt durch genomische PCR. Die Kästen repräsentieren Exons, die verbindenden Linien Introns. Die Zahlen auf den Exons beschreiben die Position im offenen Leseraster, die Zahlen auf den Introns stehen für die im Agarosegel bestimmte Introngröße.

Intron Nr.	Position (bp)	Konsensussequenz	Größe (kb)
-	Konsensusmotiv (Padgett <i>et al.</i>, 1986)	XX/GTXX ... XXAG/XX	
1	90/91	GG/GTGA ... ACAG/CT	1,2
2	274/275	GG/GTAT ... ??/GT	>2 ?
3	426/427	AG/GCAG ... ACAG/GT	1,8
4	1169/1170	AA/GTCA ... ACAG/GT	1,2

Tabelle 5: Intron/Exon Grenzen im Hamster UGT, ermittelt durch genomische PCR.

Im November 1999 wurde die genomische Sequenz für den humanen UGT in der Datenbank (GeneBank Nr. AF207550) veröffentlicht. Die Intron/Exon-Grenzen entsprachen genau den für den Hamster UGT bestimmten Grenzen. Die Größen der Introns entsprachen sich allerdings nicht, außerdem waren die Intronsequenzen nicht konserviert.

A



B

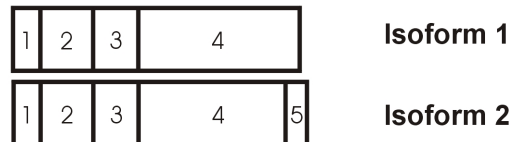


Abbildung 22: A: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des humanen UGT abgeleitet von der veröffentlichten genomischen DNA Sequenz (GeneBank Nr. AF207550). B: Schematische Darstellung der durch alternative Prozessierung verursachten zwei Isoformen für den humanen UGT.

Mit Hilfe der genomischen Sequenzinformation konnten auch genetische Basis für die beiden vorkommenden humanen Isoformen untersucht werden. Bei der Veröffentlichung der zweiten humanen Isoform wurde ein alternatives „Splicing“ der RNA als Ursache für die beiden Isoformen postuliert (Ishida *et al.*, 1996). Es war tatsächlich so, dass vor dem Terminationskodon in Exon 4 eine Konsensussequenz für den Beginn eines Introns lokalisiert war (Abbildung 22 A). Wurde diese Konsensussequenz nicht genutzt bzw. wurde die RNA an dieser Stelle nicht „gesplitt“, so entstand der humane UGT in seiner Isoform 1. Wurde die Konsensussequenz in Exon 4 genutzt, und wurde die mRNA an dieser Stelle „gesplitt“, so wurde das Ende von Exon 4 herausgeschnitten und ein 3'-gelegenes weiteres Exon genutzt. In diesem Fall entstand der humane UGT in seiner Isoform 2 (Abbildung 22 B). Das alternative „Splicing“ der mRNA als Ursache für die beiden Isoformen war demnach wegen der Konsensussequenz für eine Intron/Exon-Grenze möglich. In der genomischen Sequenz für den Hamster UGT war diese Intron/Exon-Grenze vor dem Terminationskodon in Exon 4 ebenfalls vorhanden. Sie scheint im Hamster ausschließlich genutzt zu werden, da nur ein Transporter entsprechend der Isoform 2 des humanen UGT gefunden wurde.

5.13. Untersuchung der Membrantopologie des Hamster UGT

5.13.1. Bestimmung der Lokalisation der Termini des Hamster UGT

Erste Hinweise auf die Membrantopologie sollte die Bestimmung der Lokalisation der Termini des Hamster UGT bringen. Fusionsproteine mit einem N-terminalen FLAG-Epitop bzw. einem C-terminalen HA-Epitop wurden direkt im Anschluss an die Isolierung des Transporters hergestellt (siehe 5.4.). Die Orientierung der Epitope zur Membran des Golgi-Apparates wurde über indirekte Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Die Konstrukte wurden dazu transient in 6B2-Zellen exprimiert (siehe 4.2.1.6.). 24-48 Stunden nach Transfektion wurden die Plasmamembranen der Zellen selektiv mit Digitonin permeabilisiert (Abbildung 23 A und B unten). In einem parallelen Ansatz wurden alle Membranen selektiv mit Saponin permeabilisiert (Abbildung 23 A und B oben). Wie schon bei den vorangegangenen Nachweisen subzellulärer Lokalisation (5.6. und 5.9.5.) wurden die Zellen mit dem anti-Epitop-Antikörper und einem polyklonalen Serum gegen α -Mannosidase II inkubiert. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von α -Mannosidase II diente sowohl als Marker für den Golgi-Apparat als auch als Marker für die Selektivität der durchgeführten Permeabilisierungen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Cy3-konjugierter anti-Maus-IgG- und ein Alexa 488-konjugierter anti-Ratte-Antikörper verwendet. Die Epitope beider Fusionsproteine waren nach selektiver Permeabilisierung mit Digitonin detektierbar (Abbildung 23 A und B unten). Beide Termini des UGT waren demnach auf der cytoplasmatischen Seite der Golgi-Membran lokalisiert. Dies stimmte sowohl mit dem vorgeschlagenen Topologiemodell (Abbildung 5) als auch mit Untersuchungen anderer Zucker-Nukleotid Transportern überein (Eckhardt *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 1999a; Gao und Dean, 2000).

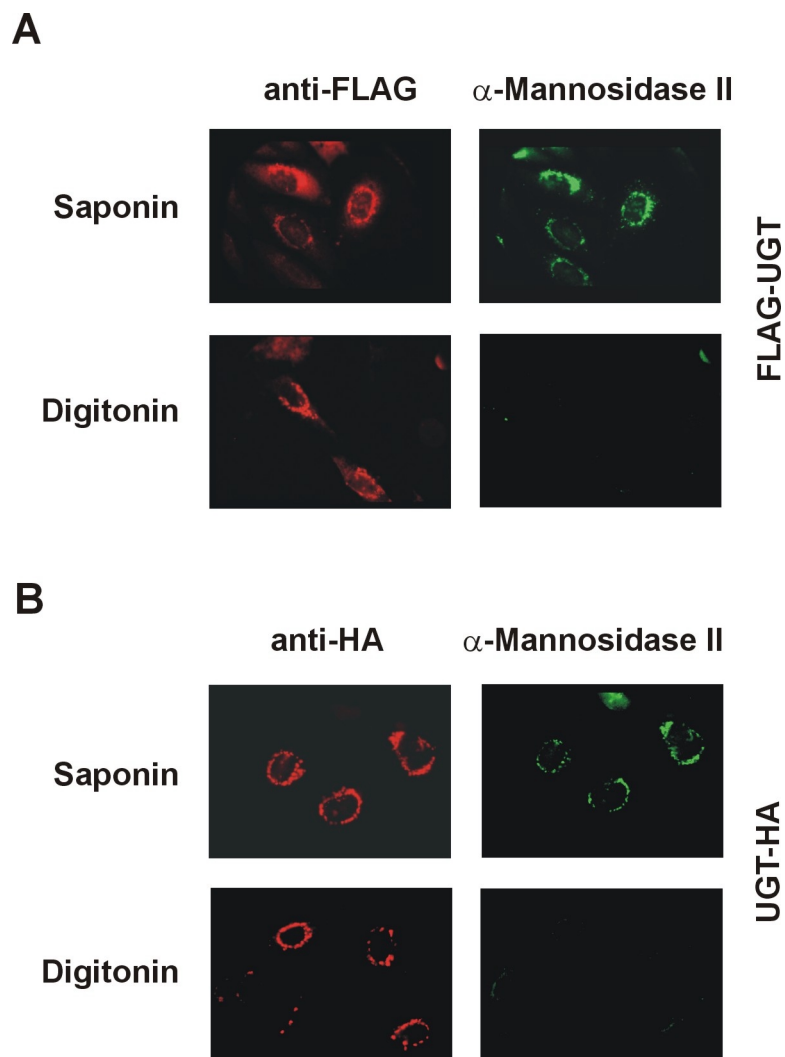


Abbildung 23: Darstellung A: des N-Terminus und B: des C-Terminus des Hamster UGT als Fusionsproteine durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Permeabilisierung der Membranen mit Saponin (A und B oben) und Digitonin (A und B unten). Entwicklung mit dem anti-FLAG- und anti-HA-Antikörper und einem polyklonalen Serum gegen α -Mannosidase II. Als sekundäre wurden Cy3 bzw. Alexa 488 konjugierte Antikörper verwendet.

5.13.2. Untersuchung der Membrantopologie des Hamster UGT durch die Insertion von Epitopen

Zur weiteren Aufklärung der Membrantopologie des Hamster UGT (Abbildung 5) wurden HA-Epitope in potentielle luminal und cytoplasmatisch lokalisierte „Loops“ des Transporters eingeführt (Abbildung 24). Mit Hilfe von Mutagenese-Oligonukleotiden (siehe 4.1.6.) wurden in das Wildtypkonstrukt mit N-terminalem FLAG-Epitop zunächst eine *Bam*HI- und eine *Nhe*I-Schnittstelle in die gewünschte Position eingeführt. Die entstandene Insertion kodierte für die Aminosäuresequenz GSNAS, einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle (N-Konstrukte). Über die eingeführten Schnittstellen wurde dann eine HA-Epitopsequenz inseriert (HA-Konstrukte).

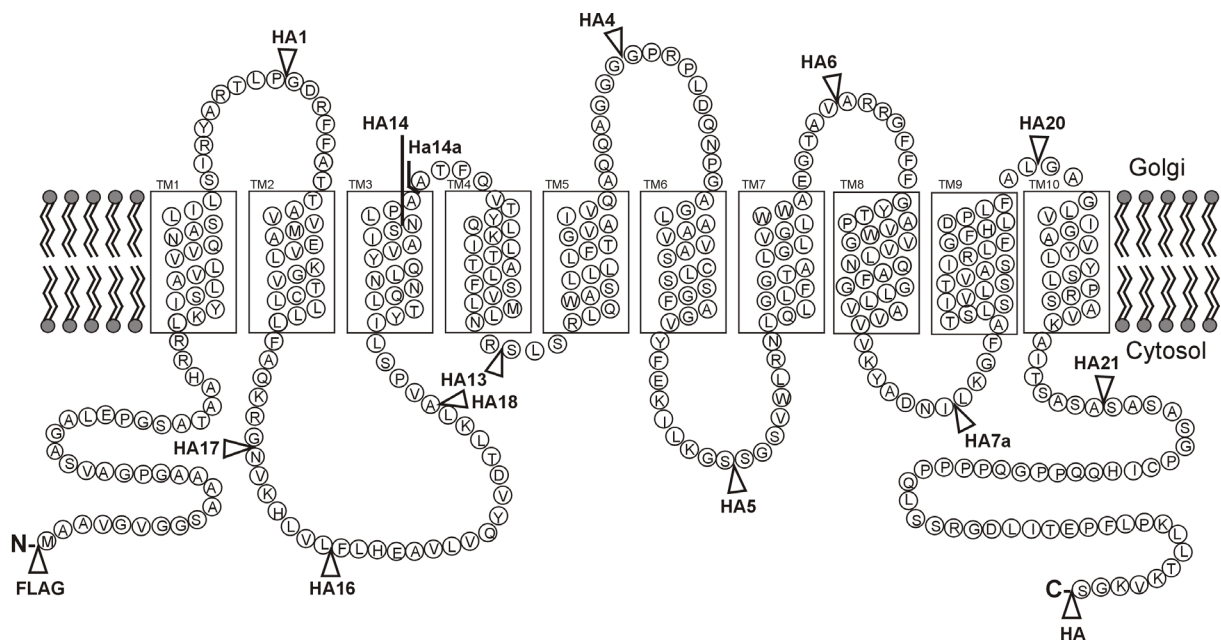


Abbildung 24: Membrantopologie-Modell des Hamster UGT mit allen eingefügten HA-Epitopen. Jedes Konstrukt enthielt nur ein Epitop.

Nach transients Transfektion in COS-7- oder Lec8-Zellen lieferten alle Konstrukte mit Ausnahme der Klone N18/HA18 und N20/HA20 stabile Proteine (Abbildung 25). Die Proteine der Konstrukte N1/HA1 und N13/HA13 wurden wiederholt schwach exprimiert.

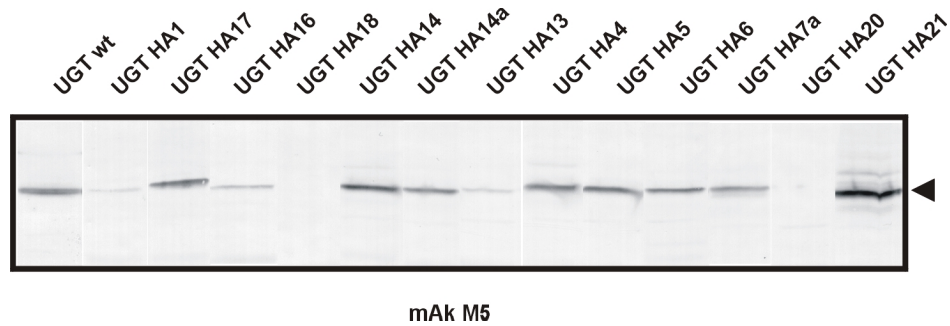


Abbildung 25: Nachweis der Proteinexpression der HA-Fusionsproteine nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen. Entwicklung des Western Blots mit anti-FLAG-Antikörper, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

Anschließend wurde die funktionelle Aktivität der Fusionsproteine bestimmt. Nach transienter Transfektion in Lec4.8.7A Zellen konnten für die Proteine der Konstrukte HA17, HA16, HA13, HA4, HA5, HA6 und HA21 über die Reexpression der PSA (siehe 5.5.) Transportaktivität nachgewiesen werden.

In Immunfluoreszenzstudien sollte nun die Orientierung der HA-Epitope im Verhältnis zur Membran des Golgi-Apparates untersucht werden. Die Konstrukte wurden dazu wie oben beschrieben (siehe 4.2.1.6.) transient in 6B2-Zellen auf Deckgläschen transfiziert und anschließend analysiert. Vermutlich wegen eines potentiellen C-terminalen ER-Rückhaltesignals (siehe 5.14.) konnten die HA-Konstrukte nicht eindeutig im Golgi-Apparat lokalisiert werden. Um das potentielle ER-Rückhaltesignals zu entfernen wurden die 3'-Enden der Konstrukte durch Verdau mit der Endonuklease *Apal* herausgeschnitten und das Plasmid anschließend religiert. Die Expressionshöhe der C-terminal verkürzten ($\Delta 360-398$) Proteine stimmte mit denen der ursprünglichen HA-Fusionsproteine überein. Die Darstellung der C-terminal verkürzten Fusionsproteine durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde wie oben beschrieben wiederholt. Bei diesen Immunfluoreszenzstudien konnten die Proteine der Konstrukte HA17, HA16, HA14, HA14a, HA4, HA5, HA6, HA7a und HA21 über ihr FLAG-Epitop im Golgi-Apparat lokalisiert werden. Darüber hinaus konnten die HA-Epitope der Proteine HA17, HA16, HA14, HA14a, HA4 und HA5 ebenfalls im Golgi-Apparat dargestellt werden. Nach selektiver Permeabilisierung waren dabei die Epitope HA4, HA14 und HA14a luminal (also innerhalb des Golgi-Apparats) lokalisiert, während die Epitope HA17, HA16 und HA5 cytoplasmatisch (also auf der Außenseite des Golgi-Apparats) lokalisiert waren. Diese Ergebnisse bestätigen das bestehende Topologiemodell. Das gesamte Modell konnte mit

diesem Epitopinsertionsansatz aber nicht aufgeklärt werden. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt.

Konstrukt	Insertion hinter AS	Expression	Aktivität	Lokalisation	
				FLAG	HA
Δ HA1	A 41	(+)	-	ER	ER
Δ HA17	G 92	+	+	Golgi	Golgi (cyt.)
Δ HA16	L 99	+	+	Golgi	Golgi (cyt.)
Δ HA18	L 115	-	-	ER	ER
Δ HA14	I 133	+	-	Golgi	Golgi (lum.)
Δ HA14a	A 138	+	-	Golgi	Golgi (lum.)
Δ HA13	R 162	(+)	+	ER	ER
Δ HA4	G 190	+	+	Golgi	Golgi (lum.)
Δ HA5	S 227	+	+	Golgi	Golgi (cyt.)
Δ HA6	V 258	+	+	Golgi	ER
Δ HA7a	I 295	+	-	Golgi	ER
Δ HA20	L 326	-	-	ER	ER
Δ HA21	A 353	+	+	Golgi	ER

Tabelle 6: Zusammenfassung des Epitopinsertionsansatzes zur Aufklärung des Topologiemodells des Hamster UGT. (+): schwache Expression, (cyt.): cytoplasmatische Lokalisation, (lum.): luminaire Lokalisation

5.13.3. Untersuchung der Membrantopologie durch Verkürzung des Hamster UGT

Zur weiteren Aufklärung der Membrantopologie des Hamster UGT bzw. zur Bestimmung der ersten und letzten Transmembrangrenze wurden N- und C-terminale Verkürzungen des UGT hergestellt (Abbildung 26).

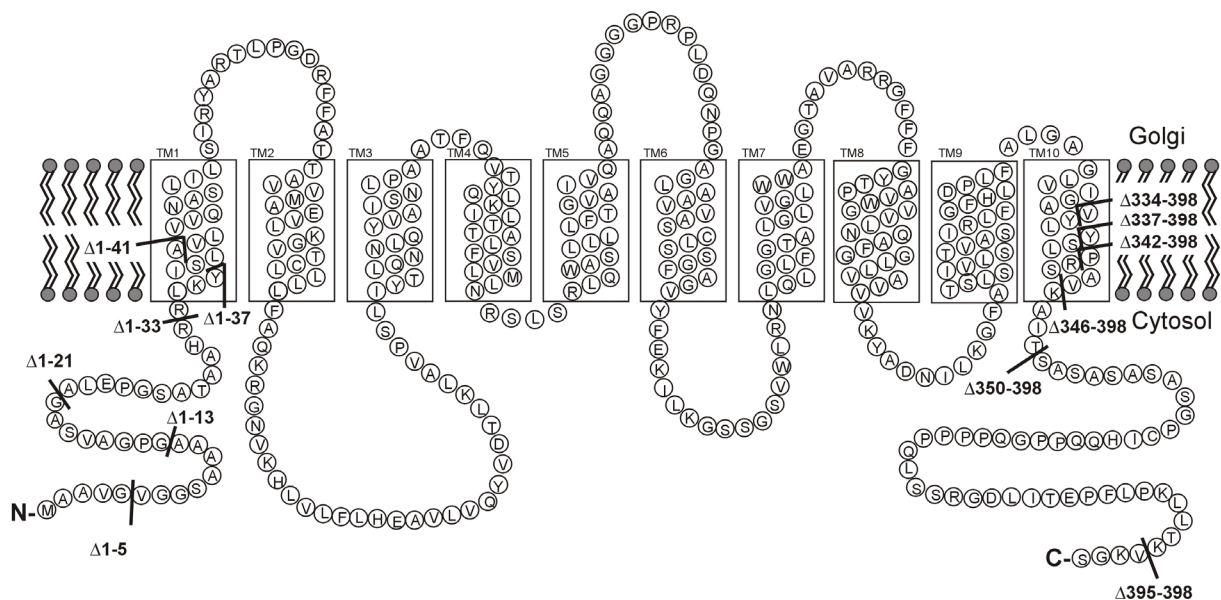


Abbildung 26: Modell des UDP-Galactose-Transporters mit N- und C-terminalen Verkürzungen

Alle N-terminal verkürzten Konstrukte enthielten ein FLAG-Epitop am verkürzten Ende, alle C-terminal verkürzten Konstrukte enthielten ein HA-Epitop am verkürzten Ende. Alle Konstrukte wurden auf ihre Expression nach transients Transfektion (siehe 5.4. und 5.9.4.), ihre subzelluläre Lokalisation in der Zelle (siehe 5.6. und 5.9.5.) und ihre funktionelle Aktivität (5.5. und 5.9.6.) untersucht. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 7 dargestellt:

Konstrukt	Verkürzung vor/hinter AS	Expression	Aktivität	Lokalisation
Δ 1-5	V6	+	+	ER
Δ 1-13	G14	+	+	ER
Δ 1-21	A22	+	+	ER
Δ 1-33	R34	-	+	ER
Δ 1-37	I38	-	-	ER
Δ 1-41	V42	-	-	ER
Δ 395-398	K394	+	+	Golgi
Δ 350-398	T349	+	+	Golgi
Δ 346-398	V345	+	+	Golgi
Δ 342-398	P341	+	(+)	Golgi
Δ 337-398	Y338	+	(+)	Golgi
Δ 334-398	V336	-	-	ER
22-341	A22/P341	+	(+)	ER
34-341	R34/P341	+	(+)	(Golgi)

Tabelle 7: Nachweis der Expression, Aktivität und subzellulären Lokalisation der N- und C-terminalen Verkürzungen des Hamster UGT. Die letzten beiden Konstrukte sind an beiden Enden verkürzt und repräsentieren ‚minimal aktive‘ Transporter. Aussagen in Klammern stehen für schwache Darstellbarkeit.

Es zeigte sich, dass die subzelluläre Lokalisation der C-terminal verkürzten Fusionsproteine im Golgi-Apparat mit ihrer Aktivität korrelierten. Möglicherweise bedingte der Verlust der Lokalisation im Golgi-Apparat den Verlust der funktionellen Aktivität. Im Fall der N-terminal verkürzten Fusionsproteine mit intaktem C-Terminus hielt das potentielle ER-Rückhaltesignal (siehe 5.14.) die Konstrukte wahrscheinlich im ER zurück. Ohne das potentielle ER-Rückhaltesignal wären die aktiven N-terminalen Verkürzungen vermutlich ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert.

Die erste N-terminale Transmembrangrenze stimmte diesen Ergebnissen zufolge gut mit der Strukturvorhersage überein: sie lag bei Aminosäure 34. Die letzte C-terminale Transmembrangrenze musste im Vergleich zur Strukturvorhersage etwas verändert werden: sie lag im Bereich von Aminosäure 338 statt 347. Der cytoplasmatisch orientierte C-Terminus ist demnach länger als vorhergesagt und auch die Topologie der letzten bzw. die letzten beiden Transmembrandomänen sind demnach anders als vorhergesagt. Interessanterweise konnte bei einer Co-Transfektion von zwei inaktiven Verkürzungskonstrukten in Lec8-Zellen funktionelle Aktivität nachgewiesen werden, sobald jede einzelne Transmembrandomäne vorhanden war.

5.13.4. Untersuchung der Membrantopologie und Definition funktionell wichtiger Domänen durch Herstellung von Chimären zwischen dem Hamster UGT und dem Maus CST

Zur Identifizierung funktionell wichtiger Domänen wurden eine Reihe von Chimären zwischen dem Hamster UGT und dem Maus CST konstruiert. Beide Transporter wurden an den Schnittstellen ihrer N-Konstrukte (5.13.2. und Eckhardt *et al.*, 1999) durch Endonukleaseverdau aufgeschnitten und die 5'- und 3'-Fragmente wurden jeweils untereinander vertauscht. So entstanden insgesamt sechzehn Chimäre mit dem 5'-Fragment des einen und dem 3'-Fragment des anderen Transporters. Nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen wurden nur fünf der sechzehn Chimären exprimiert (Abbildung 27). Keine der Chimären war in der Lage, den *lec8*- oder den *lec2*-Defekt zu korrigieren. Die Chimäre besaßen also weder UDP-Galactose noch CMP-Sialinsäure Transportaktivität.

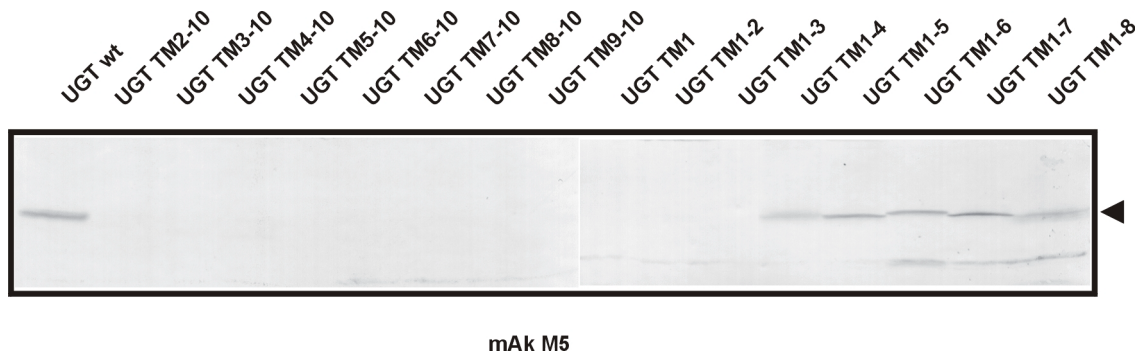


Abbildung 27: Nachweis der Expression der Chimärenkonstrukte nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen. Die Namen der Chimärenkonstrukte beschreiben den Anteil des Hamster UGT an der jeweiligen Chimäre. Alle übrigen Transmembrandomänen stammen jeweils vom Maus CST. Entwicklung des Western Blots mit dem anti-FLAG-Antikörper, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

Ebenso wie bei den Co-Transfektionen von zwei Verkürzungskonstrukten war auch nach Co-Transfektion von zwei Chimären UGT-Aktivität in der Immuncytochemie zu beobachten, sobald jede Transmembrandomäne des UGT vorlag.

5.14. Untersuchung eines potentiellen ER-Rückhaltesignals am C-Terminus des Hamster UGT

Bei den durchgeführten Immunfluoreszenzstudien war es auffällig, dass UGT-Fusionsproteine mit einem durch Verkürzung oder Verlängerung modifizierten C-Terminus deutlich besser im Golgi-Apparat lokalisierbar waren als Fusionsproteine mit einem unveränderten C-Terminus. In diesem Fall war immer eine mehr oder weniger starke Hintergrund- oder ER-Färbung zu beobachten. Der C-Terminus in seiner unveränderten Form schien demnach für die Lokalisation des Transporters zumindest mit verantwortlich zu sein. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass der C-Terminus des Hamster UGT und des humanen UGT der Isoform 2 ein abgewandeltes Dilysin-Motiv K(X)KXX enthielten, ein ER-Signal, das bei zahlreichen Membranproteinen für ihre Rückhaltung im ER verantwortlich ist (Teasdale und Jackson, 1996). Um die Bedeutung des potentiellen ER-Rückhaltesignals am C-Terminus des Hamster UGT zu analysieren wurde durch PCR ein am 3'-Ende um zwölf Basenpaare verkürztes UGT-Konstrukt hergestellt. Das exprimierte Fusionsprotein war um die letzten vier Aminosäuren verkürzt (FLAG-UGT Δ 395-398). Das Dilysin-Motiv war dadurch zerstört und der verkürzte C-Terminus ähnelte dem der Isoform 1 des humanen UGT. Der Nachweis der Expression sowie der subzellulären Lokalisation des C-terminal verkürzten Fusionsproteins wurde entsprechend den Nachweisen für die Wildtyp-Fusionsproteine durchgeführt (siehe 5.4. und 5.6.). Beide Konstrukte wurden ähnlich hoch exprimiert (Abbildung 28). In der Immunfluoreszenz bestätigte sich die deutlichere Lokalisation im Golgi-Apparat für das verkürzte Konstrukt verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt (Abbildung 29).

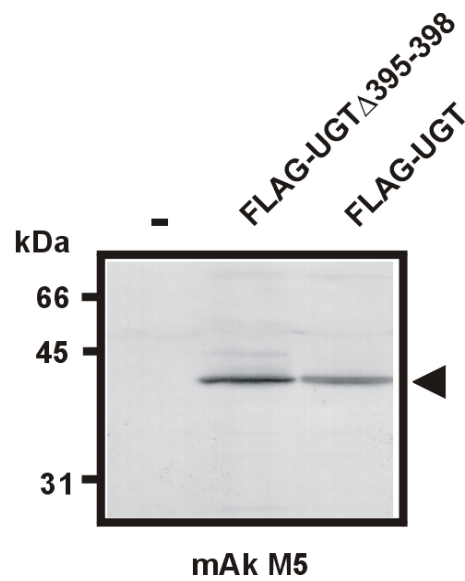


Abbildung 28: Nachweis der Expression des epitopmarkierten Wildtyps (FLAG-UGT) und eines C-terminal verkürzten (FLAG-UGT Δ 395-398) Hamster UGT nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen. Entwicklung des Western Blots mit anti-FLAG- Antikörper, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

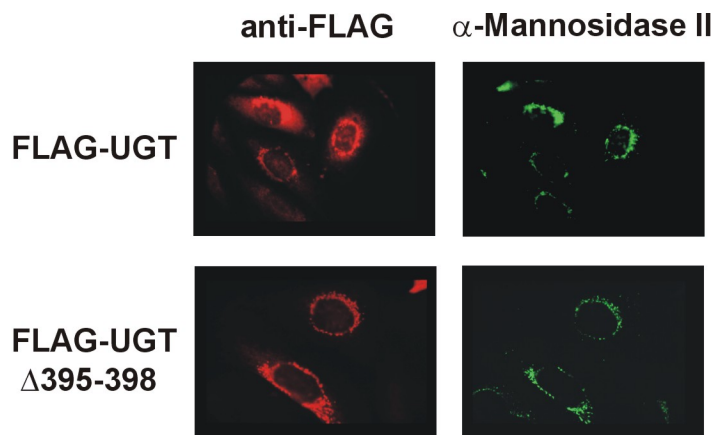


Abbildung 29: Darstellung des C-terminal verkürzten Hamster UGT Fusionsproteins über indirekte Immunfluoreszenzfärbung und Vergleich mit dem Wildtyp. Entwicklung mit dem anti-FLAG-Antikörper und einem polyklonalen Serum gegen α -Mannosidase II. Als sekundäre wurden Cy3- bzw. Alexa 488-konjugierte Antikörper verwendet.

5.15. Lokalisation von zwei *Arabidopsis thaliana* UGT

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. H. Bakker, Plant Research International, Wageningen, Niederlande, wurden zwei cDNAs aus *A. thaliana* zur Verfügung gestellt, die nach transgener Transfektion den Defekt in Lec8-Zellen korrigieren konnten. Die Pflanzengene zeigten somit UGT-Aktivität. Die Konservierung ist sowohl untereinander als auch im Vergleich mit den übrigen UGT relativ gering (Abbildung 30).

Hamster UGT	MAAVGVGGSAAAAGPGAVSAGALEPGSATAAHRRLKYISLAVLVVQNASLI-----LSIRYARTLPG---D	63
Humaner UGT1	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLKYISLAVLVVQNASLI-----LSIRYARTLPG---D	63
Humaner UGT2	MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLKYISLAVLVVQNASLI-----LSIRYARTLPG---D	63
Maus UGT	MAAVGVGGSAAAAGAGAVSSGALPEPGSTTAHRRLKYISLAVLVVQNASLI-----LSIRYARTLPG---D	63
<i>S. pombe</i> UGT	MAVKGDDVVKWGI-----PMKYIALVLLTVQNSALI-----LTLNYSRIMPGYDDK	46
<i>A. thal.</i> UGT1	MEE-----GSMFRSLL-----ALQWGWGFNV----VIIMNKWIFQK-LDFKFPDLSVSCVH--	46
<i>A. thal.</i> UGT2	MEK-----PESEKSAV----SDVGAWAMNVISVGIIMANKQLMSSSGFGFGFATTLTGPH--	53
Hamster UGT	RFFATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVFLFLHEAVLVQYVDTLKLAVP-SLIYTLQNNLQ	129
Humaner UGT1	RFFATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVFLFLHEAVLVQYVDTLKLAVP-SLIYTLQNNLQ	129
Humaner UGT2	RFFATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVFLFLHEAVLVQYVDTLKLAVP-SLIYTLQNNLQ	129
Maus UGT	RFFATTAVVMAEVLKGLTCLLLLFAQKRGNV--KHLVFLFLHEAVLVQYVDTLKLAVP-SLIYTLQNNLQ	129
<i>S. pombe</i> UGT	RYFTSTAVLLNELIKLVVCFVSVGYHQFRKNVGEAKLRAFLPQ-IFGG--DSWKLAIP-AFLYTCQNNLQ	112
<i>A. thal.</i> UGT1	--FICSSIGAYIVIK-----VLKPKPLIV-----VDPEPRWRRIFPMSFVFCINIVLG	92
<i>A. thal.</i> UGT2	--FAFTAL---VGM-----VSNATGLSA-----SKHVPLWELLW-FSIVANISIAAM	94
Hamster UGT	YVAISNLPAAATFQVTYQLKILTTALFVSLMLNRSLSRRLQWASLLELLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-N	198
Humaner UGT1	YVAISNLPAAATFQVTYQLKILTTALFVSLMLNRSLSRRLQWASLLELLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-N	198
Humaner UGT2	YVAISNLPAAATFQVTYQLKILTTALFVSLMLNRSLSRRLQWASLLELLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-N	198
Maus UGT	YVAISNLPAAATFQVTYQLKILTTALFVSLMLNRSLSRRLQWASLLELLFTGVAIVQAQQAGGGGPRPLDQ-N	198
<i>S. pombe</i> UGT	YVAAGNLTAASFQVTYQLKILTTAIFSI LLLHRRLGPMKWFSLFLLTGGIATVQLQNLNSDDQMSAGPMN	182
<i>A. thal.</i> UGT1	NVSLRYIPVSMQTIKSFPTATTVVQLVWRKYFDWRIWASLVPIVGGILLTSVTELSFN-----MF	155
<i>A. thal.</i> UGT2	NFSLMLNSVGFYQISKLSMTPVVCVLEWILHSHKYCKEVKASVMVVVI GVGICTVTDVKVN-----AK	157
Hamster UGT	PGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGS-GSVWLRNLQGLFGTALGLVGLWVAEGTAVARRGFFFGY	267
Humaner UGT1	PGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGS-GSVWLRNLQGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFFFGY	267
Humaner UGT2	PGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGS-GSVWLRNLQGLFGTALGLVGLWVAEGTAVATRGFFFGY	267
Maus UGT	PGAGLAAVVASCLSSGFAGVYFEKILKGS-GSVWLRNLQGLFGTALGLVGLWVAEGTAVASQGFFFGY	267
<i>S. pombe</i> UGT	PVTGFSAVLVACLISGLAGVYFEKVLKDTN-PSLWVRNVQLSFFSLFPCLFTILMKDYHNAENGFFFGY	251
<i>A. thal.</i> UGT1	GF--CAALFGCLATSTKTILAESSLHGYKFDSENTVYVYMAPFATMILGIPALL-LEGSGILS--WFEA	218
<i>A. thal.</i> UGT2	GFICACTAVF--STSLQQISIGSLQKYSVGSFELLSKTAPIQAISLLICGPF-VDYLLSGK--FIST	220
Hamster UGT	TPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFPHDPLFALGAG-LVIGAVY	336
Humaner UGT1	TPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFPHDPLFALGAG-LVIGAVY	336
Humaner UGT2	TPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFPHDPLFALGAG-LVIGAVY	336
Maus UGT	TPAVWGVVNLQAFGGLLVAVVVKYADNLIKGFATSLSIIVLSTVASIRLFGFPHDPLFALGAG-LVIGAVY	336
<i>S. pombe</i> UGT	NSIVWLAILLQAGGGIIVALCVAFADNIMKNRSTISISIIISLASVYLMDFKISLTFLLIGVM-LVIAATF	320
<i>A. thal.</i> UGT1	HPAPWSAL----I-IILSSGVLAFC----LNFSIFYVIHSTTAVTFNVAG-NLKVAVAVMVSWLIFRNPI	278
<i>A. thal.</i> UGT2	YQMTYGAI----FCILLSCALAVFC----NISQYLCIGRFSATSFQVLG-HMKTVCVLTLLGWLDFDSEM	280
Hamster UGT	LYSLPRSAVKAITASASASASAGPCIHQQPPGQPPPPQLSSRG-DLITEPFLPK-LLTQVKGK	398
Humaner UGT1	LYSLPRGAAKAI--ASASASASAGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRG-DLITEPFLPKSVLVK	393
Humaner UGT2	LYSLPRGAAKAI--ASASASASAGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRG-DLITEPFLPK-LLTQVKGK	396
Maus UGT	LYSLPRGAVKAI---ASASAGPCIHQQPPGQPPPPQLSS-RG-DLITEPFLPKSVLVK	390
<i>S. pombe</i> UGT	LYTKP-----ESKPSPSRGTIYI-----MTQDAAAKVDHDK---H	353
<i>A. thal.</i> UGT1	SYMNAVCGGITLVGCTFYGYVRHMLSQQTPT-GTPRTPTP-----RSKMELLPLVNDKLEGGK	336
<i>A. thal.</i> UGT2	TFKNIAGMAIAIVGMVIYSWAVDIEKQRNAKSTPHGKHSMTEDIKLLKEGVEHIDLKDELVDGDKP	347

Abbildung 30: Vergleich der Primärstruktursequenzen der UGT vom Hamster (diese Arbeit), Mensch (Miura et al., 1996, Isoform 1; Ishida et al., 1996, Isoform 2), der Maus (Ishida et al., 1999a), der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Segawa et al., 1999) und *A. thaliana* (*A. thal.* UGT1 und 2, von Dr. H. Bakker zur Verfügung gestellt). Aminosäuren, die in sechs der sieben UGT konserviert sind, sind schwarz unterlegt, in fünf der sieben dargestellten Proteinsequenzen konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt.

Nach der Herstellung und Expression von epitopmarkierten Fusionsproteinen konnte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung für beide *A. thaliana* Transporter eine subzelluläre Lokalisation im Golgi-Apparat gezeigt werden. Darüber hinaus konnte nach selektiver Permeabilisierung gezeigt werden, dass N- und C-Terminus wie beim Hamster UGT (siehe 5.13.1.) cytoplasmatisch orientiert sind.

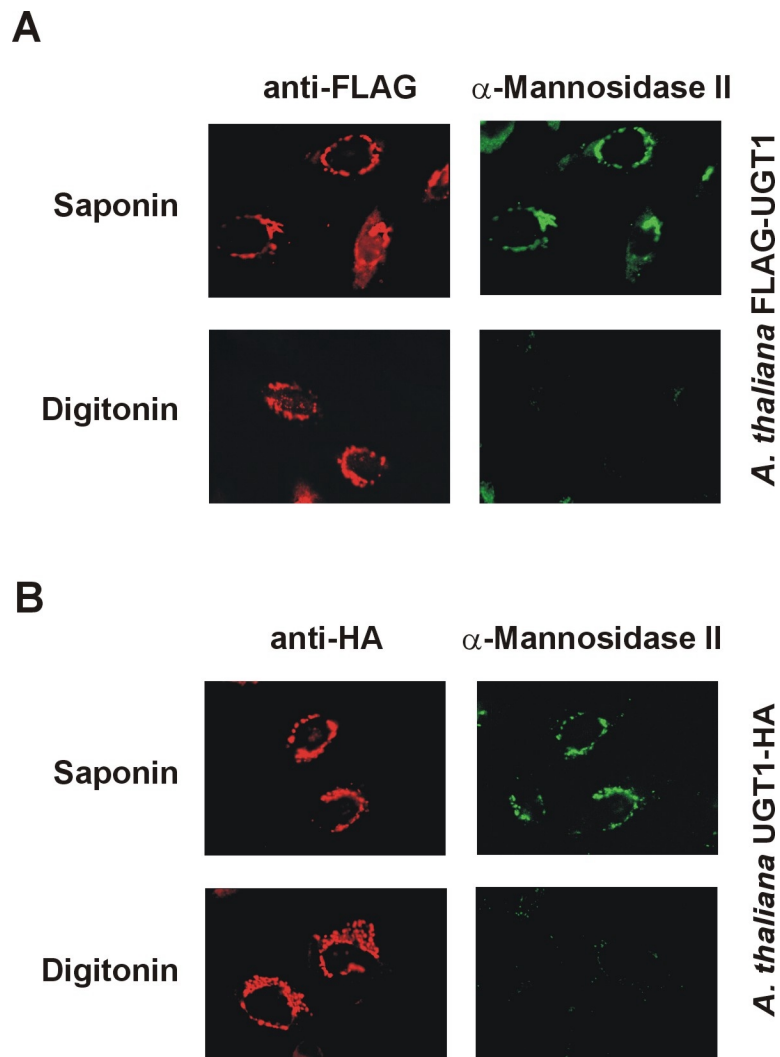


Abbildung 31: Darstellung A: des N-Terminus und B: des C-Terminus des *A thaliana* UGT1 als Fusionsprotein durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Permeabilisierung der Membranen mit Saponin (A und B oben) und Digitonin (A und B unten). Entwicklung mit dem anti-FLAG- und anti-HA-Antikörper und einem polyklonalen Serum gegen α -Mannosidase II. Als sekundäre wurden Cy3- bzw. Alexa 488-konjugierte Antikörper verwendet.

6. DISKUSSION

6.1. Isolierung eines neuen Mitglieds der UGT Familie

Mit dem Hamster UDP-Galactose Transporter (UGT) wurde ein weiteres Mitglied der Familie der Zucker-Nukleotid Transporter isoliert (Berninsone und Hirschberg, 2000). Nachdem die Sequenz des humanen UGT zu Beginn der Arbeit bereits bekannt war (Miura *et al.*, 1996), konnte das Hamsterhomolog über die Hybridisierung einer Hamster cDNA-Bank mit einer Sonde abgeleitet von der humanen Sequenz isoliert werden. Der Transporter zeigt die für diese Familie charakteristischen Merkmale. Das 398 Aminosäuren lange Protein ist 95% identisch mit den bereits bekannten UGT aus Säugern. Die Identität zu den aus Säugetierspezies isolierten UDP-*N*-Acetylglucosamin Transportern beträgt ca. 50% und zu den CMP-Sialinsäure Transportern etwa 42%. Zu den Zucker-Nukleotid Transportern aus der Hefe und *C. elegans* ist der Hamster UGT <15% identisch. Der Hamster UGT ist ein stark hydrophobes Typ III Membranprotein. In Strukturvorhersagen werden zehn Transmembrandomänen (TMD) vorgeschlagen. Immunfluoreszenzstudien zeigen, dass der Transporter zumindest hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Der humane UGT ist der einzige bisher bekannte Zucker-Nukleotid Transporter, für den zwei Isoformen beschrieben sind (Ishida *et al.*, 1996). Beide Isoformen unterscheiden sich nur in den letzten Aminosäuren des C-Terminus und sollen durch alternative Prozessierung der mRNA entstehen. Der Maus UGT ist mit der Isoform 1 des humanen Homologs identisch (Ishida *et al.*, 1999a), während der Hamster UGT mit der Isoform 2 des humanen Homologs identisch ist. Sowohl in der Maus (Ishida *et al.*, 1999a) als auch im Hamster wurde keine zweite Isoform gefunden.

Der C-Terminus ist noch aus einem anderen Grund interessant: der Terminus der humanen Isoform 2 bzw. des Hamster UGT enthält ein potentielles ER-Rückhaltesignal (K(X)KXX), das bei zahlreichen Proteinen für ihre Rückhaltung im ER verantwortlich ist (Teasdale und Jackson, 1996). Dies stimmt mit Beobachtungen aus Immunfluoreszenzstudien überein, bei denen sich Hamster UGT mit modifiziertem C-Terminus deutlich besser im Golgi-Apparat darstellen ließen als Konstrukte mit unverändertem C-Terminus. Beispiele dafür sind die beiden Wildtypkonstrukte mit einem N-terminalen FLAG- bzw. mit einem C-terminalen HA-Epitop. Das Fusionsprotein mit dem N-terminalen FLAG-Epitop und intaktem C-Terminus ließ sich nur vor einer (im Einzelexperiment verschieden stark

ausgeprägten) ER- oder Hintergrundfärbung im Golgi-Apparat darstellen. Das Fusionsprotein mit dem HA-Epitop am C-Terminus war ohne Hintergrund im Golgi-Apparat darstellbar. Zu demselben Ergebnis kam man mit dem Fusionsprotein mit N-terminalem FLAG-Epitop, dem die letzten 4 Aminosäuren am C-Terminus entfernt wurden. Das ER-Rückhaltesignal wurde durch die Verkürzung vermutlich zerstört. Die genauen Eigenschaften des ER-Rückhaltesignal werden in weiterführenden Studien analysiert.

Da nur eine Kopie des humanen UGT-Gens im Genom vorhanden ist (Bande Xp11.22-p11.23 auf dem X Chromosom; Hara *et al.*, 1993) wurde postuliert, dass die beiden Isoformen durch ein alternatives „Splicing“ derselben mRNA entstehen (Ishida *et al.*, 1996). Die genomische Organisation des UGT-Gens beim Menschen und im Hamster bestätigten dies. Im Rahmen der Sequenzierung verschiedener Hamster UGT RT-PCR-Produkte wurden häufig vorkommende Abbruchstellen gefunden, die später als Intron/Exon-Grenzen identifiziert wurden. Außerdem wurde eine humane genomische Sequenz veröffentlicht (GeneBank Nr. AF207550), von der sich dieselben Intron/Exon-Grenzen ableiten lassen. Der humane UGT besteht im Fall der Isoform 1 aus 4 Exons. Wird allerdings ein in Exon 4 liegendes Konsensusmotiv als Intron/Exon-Grenze genutzt, so wird das Ende von Exon 4 herausgeschnitten und ein dahinterliegendes Exon 5 genutzt. Auf diese Weise entsteht die Isoform 2.

6.2. Analyse von CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec8

Von den neun untersuchten Klonen der Komplementationsgruppe Lec8 zeigten nur vier (Lec8, Lec8.5H, Lec8.1C, LEC10.Lec8) ein Hybridisierungssignal in der Northern Blot Analyse. In drei dieser Klone konnte durch RT-PCR eine cDNA von der Länge des Wildtyps isoliert werden. Bei der Sequenzierung konnten einzelne Punktmutationen identifiziert werden. Die cDNA des vierten Klons ‚Lec8‘, der einzigen kommerziell erwerblichen Zelllinie dieser Komplementationsgruppe, enthielt eine Deletion von 100 Basenpaaren, die zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer vorzeitigen Termination führte. Das stark verkürzte Protein wird stabil exprimiert, es ist aber nicht wie der Wildtyptransporter im Golgi-Apparat lokalisiert. Das Fehlen des C-Terminus unterstützt eine Beobachtung von Ishida und Mitarbeitern, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus des Maus

UGT den Hamster UGT aus CHO K1-Zellen, nicht aber aus den ‚Lec8‘-Zellen präzipitieren konnten (Ishida *et al.*, 1999a).

Die identifizierten Punktmutationen (Δ Ser213, Gly281Asp, Tyr122His) in den anderen drei Klonen (Lec8.5H, Lec8.1C, LEC10.Lec8) betreffen Aminosäuren, die in allen Säugetier Zucker-Nukleotid Transportern hoch konserviert sind. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Funktion der betroffenen Sequenzabschnitte in allen bekannten Transportern identisch ist. Bestätigt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die entsprechenden Mutationen im Maus CMP-Sialinsäure Transporter gleichgerichtete Effekte haben.

Erstaunlicherweise zeigte das Konstrukt mit der Mutation Tyr122His funktionelle Aktivität in Lec8-Zellen. Ebenso verhielt sich auch das entsprechende CMP-Sialinsäure Transporter Mutationskonstrukt Tyr98His in Lec2-Zellen. Neben dem Nukleotidaustausch T364C wurde keine weitere Mutation in der cDNA der Lec8-Zelllinie (LEC10.LEC8) gefunden. Um auszuschließen, dass es sich um ein PCR-Artefakt oder um eine allelische Variation handelt, wurde auch die genomische DNA der Zelllinie LEC10.Lec8 untersucht. Während die parentale Zelllinie LEC10 keine Mutation an dieser Stelle enthält, konnte in 50% der genomischen DNA von LEC10.Lec8-Zellen der oben beschriebene Nukleotidaustausch nachgewiesen werden. Der vermutlich aktive haploide Chromosomensatz hat also die identifizierte Mutation. Da das Mutationskonstrukt auch vor dem Hintergrund der LEC10.Lec8-Zellen aktiv ist, kann es sich nicht um einen kombinierten Effekt der Mutation in dieser Zelllinie handeln. Eine naheliegende Erklärung ist, dass die Mutation bei endogener Expression ausreicht, um den UGT zu inaktivieren. Bei allen Aktivitätstests nach transienter Transfektion kommt es allerdings zu einer massiven Überexpression des Transporters in der Zelle. Möglicherweise ist die erhöhte Konzentration des Transporters für die Kompensation des Defekts verantwortlich.

Bei den übrigen Lec8-Klonen ohne stabile mRNA wurden in der RT-PCR eine Reihe von unterschiedlich verkürzten cDNAs gefunden. Bei diesen Klonen scheinen entweder Intron/Exon-Grenzen mutiert zu sein, die für die Prozessierung der mRNA verantwortlich sind, oder die Maschinerie der mRNA-Prozessierung selbst scheint bei diesen Zelllinien betroffen. Derartige verkürzte oder falsch prozessierte Produkte wurden auch in einer anderen Arbeit bei der Analyse von Had-1-Klonen gefunden, bei Mauszellen, die ebenfalls Defekte im UGT haben (Ishida *et al.*, 1999a).

Dies ist bisher die dritte Arbeit, bei der die molekularen Ursachen von Klonen einer Zelllinie analysiert werden, die einen Defekt im Transport eines Zucker-Nukleotids besitzen. In beiden vorangegangenen Arbeiten wurde neben den bereits erwähnten deletierten Produkten je eine Punktmutation (G189E im Hamster CMP-Sialinsäure Transporter, Eckhardt *et al.*, 1998; G178D im Maus UGT, Ishida *et al.*, 1999a) identifiziert. In beiden Fällen sind ebenfalls hoch konservierte Aminosäuren und damit für die Transporter essentielle Funktionen betroffen.

Die Qualität der mutiert gefundenen Aminosäuren wurde genauer untersucht. Dazu wurden Aminosäuren mit ähnlichen und konträren chemischen Eigenschaften an den betroffenen Positionen eingefügt.

Tyrosin122 kann durch andere aromatische Aminosäuren und durch Histidin ersetzt werden. Ein Austausch gegen Isoleucin, Alanin und Glutaminsäure hingegen führt zu einem inaktiven Transporter. Dies zeigt, dass in dieser Position eine aromatische bzw. im Fall des Histidins eine Aminosäure mit einer zyklischen Seitenkette notwendig ist.

In einem weiteren Lec8-Klon wurde eine Deletion von Serin213 gefunden. Durch die Insertion von Threonin oder Alanin an dieser Stelle konnte die Aktivität wieder hergestellt werden. Auch der gleichzeitige Austausch des benachbarten Serins212 zu Alanin oder, wie beim CMP-Sialinsäure Transporter in Cystein, führt zu funktionell aktiven Transportern. Wurde allerdings ein Alanin zwischen die beiden Serine212 und 213 eingeführt, so war der Transporter inaktiviert. Dies spricht dafür, dass die Inaktivierung des Hamster UGT durch die Veränderung der Geometrie der TMD begründet ist. In Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass alle Punktmutationskonstrukte im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Die Veränderung der Geometrie führt also nicht zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation des Transporters. Die Geometrie von TMD 6 scheint demnach nicht für die Golgi-Lokalisation des Hamster UGT verantwortlich zu sein.

Bei der Lec8-Mutation Glycin281 zu Asparaginsäure wurden nur wenige Aminosäureaustausche vorgenommen. In der Immunocytochemie zeigte sich, dass ein Austausch von Glycin zu Serin ebenfalls zu einem inaktiven Transporter führt, ein Austausch zu Alanin aber zu einem aktiven Transporter führt. Vorläufig lässt sich daraus ableiten, dass in dieser Position eine kleine Aminosäure mit unpolarer Seitenkette notwendig ist.

6.3. Topologie des Hamster UGT

Die Topologie des Hamster UGT wurde in verschiedenen Ansätzen analysiert. Zunächst konnte mit den beiden epitopmarkierten Wildtypkonstrukten in Immunfluoreszenzstudien nach transienter Transfektion bestätigt werden, dass beide Termini auf der cytoplasmatischen Seite der Golgimembran lokalisiert sind. Bei diesen Studien wurde die Plasmamembran und die Membran des Golgi-Apparats selektiv permeabilisiert und die Epitope auf der cytotologisch oder luminal gelegenen Seite der Golgi-Membran nachgewiesen. Als Marker für den Golgi-Apparat und für die selektive Permeabilisierung der Membran wurde α -Mannosidase II verwendet und über ein polyklonales Antiserum dargestellt.

In einem sogenannten „Epitopinsertions“-Ansatz wurden dann Fusionsproteine konstruiert, die ein HA-Epitop in einem „Loop“ zwischen zwei potentiellen TMD besitzen. Die Durchführung war wie zuvor beschrieben. Anders als bei einer Arbeit von Eckhardt und Mitarbeitern, bei der die gesamte Topologie des Maus CMP-Sialinsäure Transporter bestätigt werden konnte (Eckhardt *et al.*, 1999), konnten in diesem Fall nur die „Loops“ 2 und 6 (cytoplasmatisch) sowie die „Loops“ 3 und 5 (luminal) eindeutig auf einer Seite der Membran nachgewiesen werden. In allen anderen Fällen war die Darstellung nicht eindeutig.

In einem weiteren Ansatz wurden Verkürzungen des N- und des C-Terminus hergestellt und damit die Grenzen der ersten und letzten TMD genauer bestimmt. Die in der Strukturvorhersage vorgeschlagene N-terminale Transmembrangrenze konnte experimentell bestätigt werden, denn bei Verkürzungen bis Aminosäure 34 war das Konstrukt funktionell aktiv. Die in der Strukturvorhersage vorgeschlagene C-terminale Transmembrangrenze konnte entsprechend den Ergebnissen der Versuche verändert werden, sie liegt im Bereich von Aminosäure 338 statt 347. Der cytoplasmatisch orientierte C-Terminus ist demnach länger als vorhergesagt. Diese Versuche decken sich mit Arbeiten zum Maus UGT, bei dem ebenfalls verschiedene Verkürzungen generiert und analysiert wurden (Ishida *et al.*, 1999a). Ishida und Mitarbeiter zeigten, dass N-terminale Verkürzungen bis Aminosäure 20 bzw. 29 funktionell aktiv und im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Ebenso waren Verkürzungen des C-Terminus um 30 bzw. 39 Aminosäuren im Golgi-Apparat lokalisiert und funktionell aktiv, während eine Verkürzung um 53 Aminosäuren (entspricht Δ 339-398) inaktiv und nicht mehr im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Ishida *et al.*, 1999a).

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Topologie war die Darstellung von Chimären zwischen dem Hamster UGT und dem Maus CMP-Sialinsäure Transporter. Die Konstrukte wurden hergestellt, indem die sogenannten N-Konstrukte in den „Loops“ zwischen zwei TMD aufgeschnitten und mit dem Teil des jeweils anderen Transporters fusioniert wurden. Nur wenige der Chimäre wurden überhaupt stabil exprimiert. Für kein Chimärenkonstrukt konnte weder funktionelle Aktivität in Lec8- oder Lec2-Zellen noch eine Lokalisation im Golgi-Apparat gezeigt werden. Sowohl für die Aktivität als auch für die Lokalisation sind demnach wahrscheinlich Domänen aus verschiedenen Teilen jedes einzelnen Transporters notwendig. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass bei der Co-Transfektion von Verkürzungs- oder Chimärenkonstrukten, bei denen in der Summe alle TMD eines Transporters vorhanden sind, funktionelle Aktivität zu beobachten ist.

6.4. Studien zu den UGT aus *Arabidopsis thaliana*

In Immunfluoreszenzstudien konnte für zwei in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gefundene UGT ihre Lokalisation im Golgi-Apparat gezeigt werden. Dies ist besonders im Hinblick auf mögliche Golgi-Lokalisationssignale interessant, da die beiden Transporter sowohl unter sich (21% Identität) als auch zu allen anderen bekannten Zucker-Nukleotid Transportern (11-16% Identität) nur wenig Ähnlichkeit haben. Für beide *A. thaliana* UGT werden in Strukturvorhersagen auch jeweils zehn TMD vorhergesagt. Die Lokalisation der Transporter im Golgi-Apparat spricht dafür, dass Elemente der Tertiärstruktur für die Lokalisation der Zucker-Nukleotid Transporter im Golgi-Apparat verantwortlich sind. Möglicherweise ist die Länge der TMD oder die Topologie der Domänen in der Membran für die Lokalisation im Golgi-Apparat verantwortlich.

6.5. Ausblick

Seit 1996 wurden eine Reihe von Zucker-Nukleotid Transporter aus verschiedenen Organismen kloniert. Die bisherigen Studien bieten nur ein lückenhaftes Bild von der Struktur und Funktion dieser Proteinfamilie. Die immer umfangreicheren Sequenzinformationen in den Datenbanken werden in naher Zukunft sicher die Isolierung und Charakterisierung weiterer Zucker-Nukleotid Transporter ermöglichen. Mit Hilfe weiterer Studien zu Struktur-Funktions-Beziehungen können zusätzliche funktionell wichtige Domänen und Aminosäuren identifiziert werden. Darüber hinaus können heute noch offenen Fragen zur Tertiär- und Quartärstruktur der Zucker-Nukleotid Transporter, also die Membrantopologie und die funktionell aktive Einheit der Transporter, weiter untersucht werden. Auch die Mechanismen bei der Substraterkennung und beim Transport sind von großem Interesse.

Als Typ III Membranproteine im Golgi-Apparat können an den Zucker-Nukleotid Transportern die molekularen und strukturellen Erfordernisse für den zielgerichteten Transport und die Rückhaltung von Proteinen in der Membran des Golgi-Apparats studiert werden. Die durchgeführten heterologen Expressionen der Transporter z.B. in der Hefe *S. cerevisiae* legen nahe, dass sowohl die strukturellen Erfordernisse des Proteins als auch die Mechanismen der Rückhaltung im Golgi-Apparat zwischen den Spezies hoch konserviert sind.

Schließlich deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass die Expressionshöhen der Zucker-Nukleotid Transporter und damit die Verfügbarkeit von aktivierten Zuckern im Golgi-Apparat und ER die Aktivität der Glykosyltransferasen beeinflussen. Die Zucker-Nukleotid Transporter stellen in dieser Hinsicht interessante Faktoren bei biotechnologischen Prozessen dar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abe, M., Hashimoto, H., und Yoda, K. (1999) Molecular characterization of Vig4/Vrg4 GDP-mannose transporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **458**: 309-312.

Abeijon, C. und Hirschberg, C. B. (1987) Subcellular site of synthesis of the N-acetylgalactosamine (alpha 1-0) serine (or threonine) linkage in rat liver. *J Biol Chem* **262**: 4153-4159.

Abeijon, C., Mandon, E. C., und Hirschberg, C. B. (1997) Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci* **22**: 203-207.

Abeijon, C., Robbins, P. W., und Hirschberg, C. B. (1996) Molecular cloning of the Golgi apparatus uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter from *Kluyveromyces lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5963-5968.

Aoki, K., Sun-Wada, G. H., Segawa, H., Yoshioka, S., Ishida, N., und Kawakita, M. (1999) Expression and activity of chimeric molecules between human UDP-galactose transporter and CMP-sialic acid transporter. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 940-950.

Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., und Hirschberg, C. B. (1997) Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 12616-12619.

Berninsone, P. M. und Hirschberg, C. B. (2000) Nucleotide sugar transporters of the golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 542-547.

Capasso, J. M. und Hirschberg, C. B. (1984) Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7051-7055.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., und Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299.

Crocker, P. R. und Feizi, T. (1996) Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 679-691.

Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.

Dean, N., Zhang, Y. B., und Poster, J. B. (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 31908-31914.

Dennis, J. W., Laferte, S., Fukuda, M., Dell, A., und Carver, J. P. (1986) Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants with varying metastatic potential. *Eur J Biochem* **161**: 359-373.

- During, K. (1991) Ultrasensitive chemiluminescent and colorigenic detection of DNA, RNA, and proteins in plant molecular biology. *Anal Biochem* **196**: 433-438.
- Dwek, R. A. (1995) Glycobiology: "towards understanding the function of sugars". *Biochem Soc Trans* **23**: 1-25.
- Dwek, R. A. (1995) Glycobiology: more functions for oligosaccharides. *Science* **269**: 1234-1235.
- Eckert, V., Gerold, P., und Schwarz R.T. (1997) GPI-Anchors: Structure and Functions. In *Glycoscience status and perspectives*. Gabius, H.J. und Gabius S. (eds.) Weinheim: Chapman & Hall.
- Eckhardt, M. und Gerardy-Schahn, R. (1997) Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter. *Eur J Biochem* **248**: 187-192.
- Eckhardt, M., Gotza, B., und Gerardy-Schahn, R. (1998) Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J Biol Chem* **273**: 20189-20195.
- Eckhardt, M., Gotza, B., und Gerardy-Schahn, R. (1999) Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J Biol Chem* **274**: 8779-8787.
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., und Gerardy-Schahn, R. (1996) Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7572-7576.
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., und Gerardy-Schahn, R. (1995) Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* **373**: 715-718.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., und Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7413-7417.
- Finne, J., Bitter-Suermann, D., Goridis, C., und Finne, U. (1987) An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* **138**: 4402-4407.
- Finne, J. und Makela, 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.
- Frosch, M., Gorgen, I., Boulnois, G. J., Timmis, K. N., und 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.
- Fukuda, M. (1996) Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* **56**: 2237-2244.

- Gao, X. D. und Dean, N. (2000) Distinct Protein Domains of the Yeast Golgi GDP-mannose Transporter Mediate Oligomer Assembly and Export from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **275**: 17718-17727.
- Gerardy-Schahn, R., Bethe, A., Brennecke, T., Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Ziesing, S., Lottspeich, F., und Frosch, M. (1995) Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E- encoded endoneuraminidase Endo NE. *Mol Microbiol* **16**: 441-450.
- Gerardy-Schahn, R. und Eckhardt, M. (2000) Nucleotide Sugar Transporters in Carbohydrates. In *Oligosaccharides in Chemistry and Biology: A Comprehensive Handbook, Vol. II Biology of Saccharides*. Ernst und Hart, S. (eds.) Weinheim: Wiley-VCH, pp. 19-36.
- Grunewald, S. und Matthijs, G. (2000) Congenital disorders of glycosylation (CDG): a rapidly expanding group of neurometabolic disorders [editorial; comment]. *Neuropediatrics* **31**: 57-59.
- Guillen, E., Abeijon, C., und Hirschberg, C. B. (1998) Mammalian Golgi apparatus UDP-N-acetylglucosamine transporter: molecular cloning by phenotypic correction of a yeast mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7888-7892.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hara, T., Endo, T., Furukawa, K., Kawakita, M., und Kobata, A. (1989) Elucidation of the phenotypic change on the surface of Had-1 cell, a mutant cell line of mouse FM3A carcinoma cells selected by resistance to Newcastle disease virus infection. *J Biochem (Tokyo)* **106**: 236-247.
- Hara, T., Hattori, S., und Kawakita, M. (1989) Isolation and characterization of mouse FM3A cell mutants which are devoid of Newcastle disease virus receptors. *J Virol* **63**: 182-188.
- Hara, T., Yamauchi, M., Takahashi, E., Hoshino, M., Aoki, K., Ayusawa, D., und Kawakita, M. (1993) The UDP-galactose translocator gene is mapped to band Xp11.23-p11.22 containing the Wiskott-Aldrich syndrome locus. *Somat Cell Mol Genet* **19**: 571-575.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001) Intracellular Functions of N-linked Glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Herrler, G., Gross, H. J., und Brossmer, R. (1995) A synthetic sialic acid analog that is resistant to the receptor-destroying enzyme can be used by influenza C virus as a receptor determinant for infection of cells. *Biochem Biophys Res Commun* **216**: 821-827.

- Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., und Abeijon, C. (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **67:49-69**: 49-69.
- Hirschberg, C. B. und Snider, M. D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **56:63-87**: 63-87.
- Hong, K., Ma, D., Beverley, S. M., und Turco, S. J. (2000) The Leishmania GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry* **39**: 2013-2022.
- Höltke, H. J. und Kessler, C. (1990) Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res* **18**: 5843-5851.
- Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., und Kawakita, M. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the human UDP-galactose transporter, and of related complementary DNAs belonging to the nucleotide-sugar transporter gene family. *J Biochem (Tokyo)* **120**: 1074-1078.
- Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M., und Kawakita, M. (1999) Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 68-77.
- Ishida, N., Yoshioka, S., Iida, M., Sudo, K., Miura, N., Aoki, K., und Kawakita, M. (1999) Indispensability of transmembrane domains of Golgi UDP-galactose transporter as revealed by analysis of genetic defects in UDP-galactose transporter-deficient murine had-1 mutant cell lines and construction of deletion mutants. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 1107-1117.
- Kawakita, M., Ishida, N., Miura, N., Sun-Wada, G. H., und Yoshioka, S. (1998) Nucleotide sugar transporters: elucidation of their molecular identity and its implication for future studies. *J Biochem (Tokyo)* **123**: 777-785.
- Kean, E. L. (1991) Sialic acid activation. *Glycobiology* **1**: 441-447.
- Kelm, S. und Schauer, R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* **175:137-240**: 137-240.
- Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54:631-64**: 631-664.
- Kuhn, N. J. und White, A. (1976) Evidence for specific transport of uridine diphosphate galactose across the Golgi membrane of rat mammary gland. *Biochem J* **154**: 243-244.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lubke, T., Marquardt, T., von Figura, K., und Korner, C. (1999) A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *J Biol Chem* **274**: 25986-25989.
- Ma, D., Russell, D. G., Beverley, S. M., und Turco, S. J. (1997) Golgi GDP-mannose uptake requires Leishmania LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem* **272**: 3799-3805.
- Matthias, P., Muller, M. M., Schreiber, E., Rusconi, S., und Schaffner, W. (1989) Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. *Nucleic Acids Res* **17**: 6418.
- Miura, N., Ishida, N., Hoshino, M., Yamauchi, M., Hara, T., Ayusawa, D., und Kawakita, M. (1996) Human UDP-galactose translocator: molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J Biochem (Tokyo)* **120**: 236-241.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., und Kiss, J. Z. (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* **17**: 413-422.
- Münster, A. K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P., und 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.
- Nuwayhid, N., Glaser, J. H., Johnson, J. C., Conrad, H. E., Hauser, S. C., und Hirschberg, C. B. (1986) Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **261**: 12936-12941.
- Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S., und Sharp, P. A. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* **55**: 1119-1150.
- Perez, M. und Hirschberg, C. B. (1985) Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* **260**: 4671-4678.
- Perez, M. und Hirschberg, C. B. (1986) Topography of glycosylation reactions in the rough endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **261**: 6822-6830.
- Perez, M. und Hirschberg, C. B. (1987) Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Methods Enzymol* **138:709-15**: 709-715.
- Pfeffer, S. R. und Rothman, J. E. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem* **56:829-52**: 829-852.
- Puglielli, L. und Hirschberg, C. B. (1999) Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *J Biol Chem* **274**: 35596-35600.
- Puglielli, L., Mandon, E. C., Rancour, D. M., Menon, A. K., und Hirschberg, C. B.

- (1999) Identification and Purification of the Rat Liver Golgi Membrane UDP-N-acetylgalactosamine Transporter. *J Biol Chem* **274**: 4474-4479.
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P., und Sander, C. (1995) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* **4**: 521-533.
- Rougon, G. (1993) Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* **61**: 197-207.
- Roy, S. K., Chiba, Y., Takeuchi, M., und Jigami, Y. (2000) Characterization of Yeast Yea4p, a uridine diphosphate-N- acetylglucosamine transporter localized in the endoplasmic reticulum and required for chitin synthesis. *J Biol Chem* **275**: 13580-13587.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schachner, M. und Martini, R. (1995) Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci* **18**: 183-191.
- Schachter, H. und Roseman, S. (1980) Mammalian glycosyltransferases: Their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Lennarz, W. J. (ed.) New York: Plenum Press, pp. 85-160.
- Segawa, H., Ishida, N., Takegawa, K., und Kawakita, M. (1999) Schizosaccharomyces pombe UDP-galactose transporter: identification of its functional form through cDNA cloning and expression in mammalian cells. *FEBS Lett* **451**: 295-298.
- Sommers, L. W. und Hirschberg, C. B. (1982) Transport of sugar nucleotides into rat liver Golgi. A new Golgi marker activity. *J Biol Chem* **257**: 10811-10817.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Sprong, H., Kruithof, B., Leijendekker, R., Slot, J. W., van Meer, G., und van der Sluijs, P. (1998) UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **273**: 25880-25888.
- Stanley, P. (1983) Lectin-resistant CHO cells: selection of new mutant phenotypes. *Somatic Cell Genet* **9**: 593-608.
- Stanley, P. (1989) Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol Cell Biol* **9**: 377-383.

Stanley, P. (1993) Use of Mammalian Cell Mutants to Study the Functions of N- and O-linked Glycosylation. In *Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates*. Roberts, D. and Mecham, R.P. (eds.) San Diego: Academic Press, Inc., pp. 181-222.

Stanley, P. und Siminovitch, L. (1977) Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic Cell Genet* **3**: 391-405.

Stanley, P., Sundaram, S., und Sallustio, S. (1991) A subclass of cell surface carbohydrates revealed by a CHO mutant with two glycosylation mutations. *Glycobiology* **1**: 307-314.

Sun-Wada, G. H., Yoshioka, S., Ishida, N., und Kawakita, M. (1998) Functional expression of the human UDP-galactose transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)* **123**: 912-917.

Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S., und Takegawa, K. (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* gms1+ gene encodes an UDP-galactose transporter homologue required for protein galactosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 121-125.

Takegawa, K., Tanaka, N., Tabuchi, M., und Iwahara, S. (1996) Isolation and characterization of a glycosylation mutant from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 1156-1159.

Taki, T., Ogura, K., Rokukawa, C., Hara, T., Kawakita, M., Endo, T., Kobata, A., und Handa, S. (1991) Had-1, a uridine 5'-diphosphogalactose transport-defective mutant of mouse mammary tumor cell FM3A: composition of glycolipids, cell growth inhibition by lactosylceramide, and loss of tumorigenicity. *Cancer Res* **51**: 1701-1707.

Teasdale, R. D. und Jackson, M. R. (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 27-54.

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130.

Wysocki, L. J. und Sato, V. L. (1978) "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2844-2848.

Yoshioka, S., Sun-Wada, G. H., Ishida, N., und Kawakita, M. (1997) Expression of the human UDP-galactose transporter in the Golgi membranes of murine Had-1 cells that lack the endogenous transporter. *J Biochem (Tokyo)* **122**: 691-695.

Zhang, J. X., Braakman, I., Matlack, K. E., und Helenius, A. (1997) Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell* **8**: 1943-1954.

Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., und 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.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Komplementäre DNA
CMP	Cytosinmonophosphat
CsCl	Cäsiumchlorid
CSPD	di-Natrium-3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo-[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat
CST	CMP-Sialinsäure Transporter
CTP	Cytosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo NE	Endoneuraminidase NE
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g	Mittlere Erdbeschleunigung; 9.81 m/s ²
Gal	Galactose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCN	Guanidiniumisothiocyanat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GMT	GDP-Mannose Transporter
GTP (G)	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) oder human
HA	Hemagglutinin
ham	Hamster
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute(n)
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-(Boten-)RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSA	Polysialinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Sia	Sialinsäure
TAE	Tris-Acetate-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit oder Uridintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat
UGlcNAcT	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin Transporter
UGT	UDP-Galactose Transporter
UMP	Uridinmonophosphat
UTP (U)	Uridintriphosphat
Vgl.	Vergleich
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid

ANHANG

Danksagungen

Lebenslauf

Publikationen

Erklärung

DANKSAGUNGEN

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn für die Ermöglichung und Betreuung meiner Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe im Institut für Medizinische Mikrobiologie. Neben fachlicher Unterstützung bedanke ich mich auch herzlich für wunderbare Weihnachtsessen und Grillfeste mit der Arbeitsgruppe.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Dieter Bitter-Suermann, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, für die „übergeordnete“ Unterstützung in seinem Institut und darüber hinaus für die unvergesslichen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern.

Herrn Prof. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Korreferates und seine liebenswürdige und kontinuierliche Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei allen kurz- oder längerfristigen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe (Christoph Becker, Andrea Bethe, Jean-Michel Brezun, Matthias Eckhardt, Birgit Gotza, Jens Klockgether, Martina Mühlenhoff, Anja Münster, Kathrin Oelgeschläger, Kerstin Potthast, Antje Schmitt, Ulrich Siegers, Katharina Stummeyer, Lihua Wang und Birgit Weinhold) für ihre Unterstützung, gute Ratschläge, Hilfsbereitschaft, bedingte Toleranz meines Musikgeschmacks und einiges mehr.

Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes möchte ich danken für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Karl-Friedrich Riedel („Friedel“) danke ich für nette Gespräche (siehe „12 Uhr-Mensagänger“) und logistische Unterstützung.

Den „12 Uhr-Mensagängern“ danke ich für unterhaltsame Mittagspausen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Claudia, meiner Familie und meinen Freunden, die mir Liebe, Freundschaft, Rückhalt und vieles mehr gegeben haben und mit deren Unterstützung ich mein Studium und diese Arbeit vollenden konnte.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Stefan Oelmann
Geburtsdatum: 22.10.1973
Geburtsort: Bochum

Schulbildung

1979 - 1983 Friedensgrundschule in Dortmund
1983 - 1992 Reinoldus- und Schiller-Gymnasium in Dortmund
05.07.1992 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1992 - 1997 Studium der Biochemie an der Universität und Medizinischen Hochschule in Hannover
1994 Diplomvorprüfung
1997 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Titia de Lange an der Rockefeller Universität in New York, USA.
Titel: „Evolutionary and functional analysis of the TRF family of telomeric proteins“
03.11.1997 Diplom im Fach Biochemie

Dissertation

1998 - 2001 Promotion in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn im Institut für Medizinische Mikrobiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover

Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“

PUBLIKATIONEN

Artikel

Broccoli, D., Chong, L., **Oelmann, S.**, Fernald, A.A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M., und de Lange, T. (1997) Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum. Mol. Genetics*, **6**, 69-76

Smogorsewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., **Oelmann, S.**, Schaefer, M., Schnapp, G., und de Lange, T. (2000) Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1659-1668

Oelmann S., Stanley P., und Gerardy-Schahn R. (2001) Point Mutations that Inactivate Both the UDP-Galactose and CMP-Sialic Acid Transporters Identified in Lec8 CHO Glycosylation Mutants. *J. Biol. Chem.*

Gerardy-Schahn R., **Oelmann S.**, Bakker H. (2001) Nucleotide-sugar transporters: biological and functional analysis. (Review) *Biochimie*

Bakker H., **Oelmann S.**, Jordi W., Lommen A., Gerardy-Schahn R., Bosch D. Molecular Cloning of two *Arabidopsis thaliana* UDP-Galactose Transporters by Complementation of a Deficient Chinese Hamster Ovary Cell Line. Manuskript in Vorbereitung

Kongressbeiträge (Abstracts/Poster)

Oelmann S., Eckhardt M., Stanley P. und Gerardy-Schahn R. (1998) Molecular Analysis of the Lec8 Complementation Group. *10th Joint Meeting of the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie", the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie"*, Nuland, Niederlande

Eckhardt M., **Oelmann S.**, Gotza, B. und Gerardy-Schahn R. (1999) The sugar nucleotide transporters for CMP-sialic acid and UDP-galactose: structure function relationships. *GLYCO XV*, Tokyo, Japan, Abstract publiziert im *Glycoconjugate Journal*, **16**

Oelmann S., Stanley P. und Gerardy-Schahn R. (1999) Molecular Analysis of the Complementation Group Lec8. *BioMembranForum '99*, Jena, Abstract publiziert in *Biological Chemistry*, Special Supplement, 380

Oelmann S., Stanley P. und Gerardy-Schahn R. (1999) Identification of different point mutations in the Lec8 Complementation Group. *11th Joint Meeting of the "Studiengruppe Glykokonjugate der GBM", the "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie"*, Bonn

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem versichere ich an Eides statt, dass die zugrundeliegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, 02.02.2001