

Universität Hannover

Abteilung Zelluläre Chemie
im Zentrum Biochemie der
Medizinischen Hochschule Hannover

Studien zur subzellulären Lokalisierung
der Zuckernukleotidtransporter für
UDP-Galactose und CMP-Sialinsäure

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Roland Kabuß

geboren am 12. Januar 1963 in Böblingen

2005

Referentin: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Prüfung: 21.07.2005

Schlagworte:

Dilysin-Motiv, ER-Signal, ER-Retention, N-Glykosylierung, Zucker-Nukleotid
Transporter, UDP-Galactose Transporter, CMP-Sialinsäuretransporter, SLC35A2

Key words:

Di-lysine-motif, ER-signal, ER-retention, N-glycosylation, Nucleotide-sugar transporter,
UDP-galactose transporter, CMP-sialic-transporter, SLC35A2

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Abstract	2
3.	Einleitung	3
3.1	Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen	3
3.2	Die Biosynthese von Glykanstrukturen	3
3.3	Krankheitsbilder, die auf die fehlerhafte Biosynthese von Glykanstrukturen zurückzuführen sind: <i>Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)</i>	5
3.4	Nucleotid-Zucker Transporter (NST)	6
3.4.1	Die Funktion der NST-Transporterproteine	6
3.4.2	Komplementationsgruppen und Komplementationsklonierung	9
3.4.3	Klonierung von Zucker-Nucleotid-Transportern	9
3.4.4	Die Klonierung des UDP-Galactose-Transporters	10
3.4.5	Die Polysialinsäure	10
3.4.6	Struktur der NST-Transporterproteine	11
3.4.7	Die Familie der NST-Transporterproteine	13
3.5	Der UDP-Galactosetransporter	15
3.5.1	Der UGT1 und der UGT2	16
3.5.2	Lokalisierung	16
3.5.3	Das ER-Rückhaltesignal	17
3.5.4	Die genomische Organisation des UDP-Gal-Transporters	18
3.6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	20
3.7	Ziele der Arbeit	20
4.	Material und Methoden	21
4.	Material und Methoden	21
4.1	Materialien	21
4.1.1	Geräte	21
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
4.1.3	Chemikalien	23

4.1.4	Nährmedien, Puffer und Zusätze	25
4.1.5	Zelllinien	27
4.1.6	Bakterienstämme	27
4.1.7	Plasmide/Vektoren	27
4.1.8	Oligonukleotide	28
4.1.9	Enzyme	31
4.1.10	Molekulargewichtsmarker	31
4.1.10.1	DNA-Marker für Agarose-Gelelektrophorese	31
4.1.10.2	Protein-Marker für SDS-PAGE	31
4.1.11	Antikörper	32
4.1.11.1	Primärantikörper	32
4.1.11.2	Sekundärantikörper	32
4.1.12	„Kits“	33
4.1.13	Software	33
4.2.	Zellbiologische Methoden	34
4.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	34
4.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
4.2.3	Auftauen von Zellen	34
4.2.4	Einfrieren von Zellen	34
4.2.5	Anlagerung von Antikörpern an Petrischalen	35
4.2.6	Selektion von Zellen durch „ <i>Panning</i> “	35
4.2.7	Transiente Transfektion mit Lipofectamin	35
4.2.8	Immuncytochemische Darstellung PSA-positiver Zellen	36
4.2.9	Immunfluoreszenz	36
4.2.10	FACS Analyse von CHO Zellen mit dem Antikörper 735	37
4.3	Proteinbiochemische Methoden	38
4.3.1	Lysieren von Zellen	38
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.3.3	Western Blot Analyse	39
4.3.4	Entwicklung von Western Blots mit Antikörpern	40
4.3.5	Farbreaktion mit NBT/BCIP	40
4.4	Molekularbiologische Methoden	41
4.4.1	„ <i>Quick Checks</i> “ von Plasmiden	41

4.4.2	Analytische Plasmidpräparation	41
4.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	41
4.4.4	Mini-Plasmidpräparation	42
4.4.5	Midi-Plasmidpräparation	42
4.4.6	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	43
4.4.7	Präzipitation von DNA	43
4.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
4.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	44
4.4.10	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	44
4.4.11	Restriktionsspaltung von DNA	44
4.4.12	Dephosphorylierung von DNA	45
4.4.13	Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotidadapttern	45
4.4.14	Ligation von DNA	45
4.4.15	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Zellen	46
4.4.16	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	46
4.4.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
4.4.18	Zielgerichtete Mutagenese von DNA	47
4.4.19	DNA-Sequenzierung	48
5.	Ergebnisse	49
5.1	Bestimmung der subzellulären Lokalisierung	49
5.2	Die Lokalisierung des hUGT1 und des hUGT2	49
5.3	Die Bedeutung des Lysins an Position -3 für die Lokalisierung	52
5.4	Das KxKxx Motiv ist verantwortlich für die ER-Retention	54
5.5	Generierung und Lokalisierung eines künstlichen ER-Signals des hamUGT und des mCST	58
5.6	Erzeugte Konstrukte	60
5.7	Aktivitätstest mit der FACS-Analyse	60
5.7.1	Aktivitätstest mit der FACS-Analyse in Lec2 Zellen	61
5.7.2	Aktivitätstest mit der FACS-Analyse in Lec8 Zellen	62
5.8	Nachweis der Aktivität der potenziellen Transporterproteine aus <i>C. elegans</i>	63
5.9	Potenzielle Transporterproteine in <i>C. elegans</i>	65

6	Diskussion	67
6.1	Lokalisierung durch das Dilysin-Motiv	67
6.2	Starkes und schwaches ER-Rückhaltesignal	67
6.3	Gründe für eine Lokalisierung im ER	68
6.4	COP-Vesikel sorgen für den Rücktransport aus dem Golgi	69
6.5	Aktivität der Transporter mit unterschiedliche ER-Signalen	71
6.6	Topologie des UGT	71
6.7.	Substratspezifität der potenziellen Transporter in <i>C. elegans</i>	73
6.8	Zusammenfassung und Ausblick	75
7.	Literatur	76
8.	Anhang	85
8.1	Abkürzungsverzeichnis	86
8.2	Danksagungen	89
8.3	Lebenslauf	90
8.4	Publikationen	91
8.4.1	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	91
8.4.2	Kongressbeiträge (Abstracts/Poster)	91
8.4.3	Kongressbeiträge (Vorträge)	92
8.5	Erklärung	93

1. Zusammenfassung

Nucleotid-Zucker Transporter versorgen hauptsächlich die Glykosyltransferasen im Golgi mit Substrat. Einige Glykosyltransferasen im ER benötigen allerdings ebenfalls aktivierte Zucker. Kürzliche Studien haben gezeigt, dass UDP-Galactose (UDP-Gal) das Substrat für die ER-ständige Ceramidgalactosyltransferase (Cer-GalT) ist. Zellen, die Cer-GalT exprimieren, halten den UDP-Gal Transporter im ER zurück, da Cer-GalT einen Komplex mit dem UDP-Gal Transporter ausbildet. Mit der vorliegenden Doktorarbeit wird ein zweiter aktiver Mechanismus für die ER-Lokalisierung des UDP-Gal-Transporters beschrieben.

Der UDP-Gal-Transporter wird in zwei Spleißvarianten exprimiert, dem UGT1 und dem UGT2. Diese beiden Proteine unterscheiden sich nur am absoluten C-Terminus. Während die endterminal markierte Form des UGT1 ausschließlich im Golgi lokalisiert ist, zeigt ein ähnliches Konstrukt des UGT2 eine Verteilung in beiden Kompartimenten. Das Dilysin-motiv **KVKGS**, welches am C-Terminus des UGT2 lokalisiert ist, konnte als Ursache für die Lokalisierung des UGT2 sowohl im Golgi als auch im ER verantwortlich gemacht werden. Spezifische Mutationen in der Sequenz des ER-Signals sorgen dafür, dass das Transporterprotein vollständig im Golgi zu finden ist. Ferner reicht eine Übertragung des Dilysin-Motivs an den CMP-Sialinsäuretransporter aus, um dieses Protein nun teilweise ins ER umzuverteilen. Es ist daraufhin sowohl im ER, als auch im Golgi zu finden, obwohl es im Wildtyp eigentlich ausschließlich im Golgi lokalisiert ist. Ein Ersetzen des **KVKGS**-Signals durch ein stärkeres ER-Rückhaltesignal sorgt dafür, dass sowohl der UGT als auch der CST vollständig im ER verbleiben.

2. Abstract

Nucleotide-sugar transporters supply mainly the Golgi glycosyltransferases with substrates. Some glycosyltransferases in the ER, however, also use activated sugars. Recent studies have demonstrated that UDP-galactose (UDP-Gal) is the substrate for the ER resident ceramide-galactosyltransferase (Cer-GalT) and cells expressing cer-GalT are capable to retain the UDP-Gal transporter by physical contacts formed between the two proteins. Here, I describe a second active mechanism for ER localisation of the UDP-Gal transporter. The UDP-Gal transporter is produced in two splice forms, (UGT1) and UGT2. The proteins vary only at the extreme C-terminus but show different intracellular distribution. While N-terminally epitope tagged forms of UGT1 localize exclusively to the Golgi, similar constructs of UGT2 show both ER and Golgi localisation. The di-lysine motif **KVKGS** contained in UGT2 could be identified to be responsible for the dual localisation because: (1.) disturbance of the signal via site specific mutation or C-terminal extension completely shifts the transporter to the Golgi, (2.) transfer of the di-lysine motif is sufficient to partially redistribute the Golgi CMP-sialic acid transporter to the ER, (3.) replacement of **KVKGS** by the strong ER retention signal **KKNT** completely retains UGT2 in the ER.

3. Einleitung

3.1 Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen

Zucker sind nicht nur zur Energiegewinnung und Speicherung für den Körper von Bedeutung. Weitere wichtige Funktionen haben Zucker zum Beispiel bei der Unterscheidung der Zelle von *Selbst* und *Fremd*. Ein Beispiel dafür sind die Blutgruppenantigene die durch Zuckerstrukturen auf den Erythrozyten und anderen Körperzellen ausgebildet werden. Auch Bakterien wie *Escherichia coli* K1 umgeben sich mit einer dichten Hülle aus Zuckerstrukturen, der Glykocalix, um dem Immunsystem höherer Organismen oder dem Angriff von Viren zu entgehen. Viren ihrerseits machen sich diese Tatsache zu Nutze und spezialisieren sich auf bestimmte Strukturen der Zelloberflächen. Sie bilden Proteine, die ganz bestimmte Zucker auf der Oberfläche von Zellen erkennen, binden und hydrolysieren um sich so zur Zellmembran vorzuarbeiten.

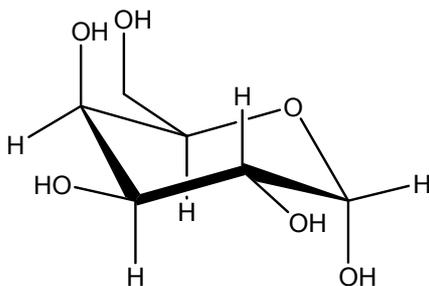
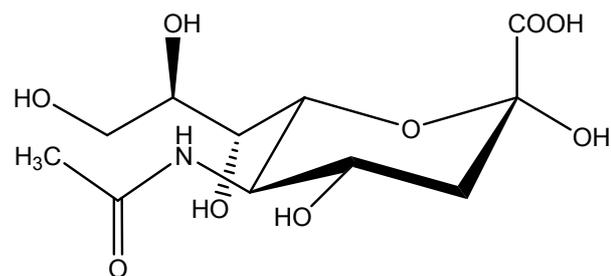


Abb. 1
 α -D-Galactopyranose



Sialinsäure, N-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac, NANA

3.2. Die Biosynthese von Glykanstrukturen

Die Glykosylierung von Proteinen kann in tierischen Zellen auf drei Wegen geschehen; durch N-Glykosylierung mit einer Amidbindung an die γ -Aminogruppe eines Asparaginrestes (Asn) (Kornfeld und Kornfeld 1985), durch O-Glykosylierung über die Hydroxygruppen von Serin (Ser)-, Threonin (Thr)- oder 5-Hydroxylysinresten (Schachter und Roseman 1980) oder mit Amidbindung an die C-terminale Aminosäure einer Peptidkette (Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine (Eckert *et al.* 1997)). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Lokalisierung des UDP-Galactose-Transporters, eines Faktors entlang des Biosynthesewegs komplexer Glykanstrukturen. Anhand des Schemas in Abb. 3 wird das Zusammenspiel einiger an der N-Glykosylierung beteiligter Faktoren veranschaulicht. Die Synthetasen sind im Cytoplasma, bzw. im Fall der CMP-Sialinsäure Synthetase im Zellkern lokalisiert (Kean *et al.* 1991; Münster *et al.* 1998).

Sie aktivieren spezifisch die Zuckermoleküle durch Verknüpfung mit einem Nucleotid- bzw. Monophosphat (z.B. GDP bei Fucose, UDP bei Galactose oder CMP bei der Sialinsäure). Die Transferasen (vgl. Gal-T und Sia-T in Abb. 3) im Golgi-Apparat, von denen es viele verschiedene gibt, katalysieren spezifisch die Verknüpfung der aktivierten Zucker mit dem naszierenden Oligosaccharid.

Die Zucker-Nucleotid-Transporter sind in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert und transportieren spezifisch die im Cytoplasma bzw. im Zellkern bereit gestellten aktivierten Zucker in den Golgi-Apparat, wo sie dann als Substrate für die Transferasen zur Verfügung stehen. Durch die Kompartimentierung der Zelle wird die Aktivierung der Zucker im Cytoplasma bzw. Zellkern räumlich von den Transferasereaktionen im Golgi-Apparat getrennt. Diese räumliche Trennung wird durch die Zucker-Nucleotid-Transporter überwunden. Die Transporter sind somit essenzielle Faktoren bei der Glykosylierung. Neben den in Abb. 2 gezeigten und im Text genannten Faktoren sind viele weitere Faktoren beteiligt, die unter anderem für den vektorialen Transport des Proteins sowohl innerhalb der Kompartimente als auch zwischen den Kompartimenten verantwortlich sind.

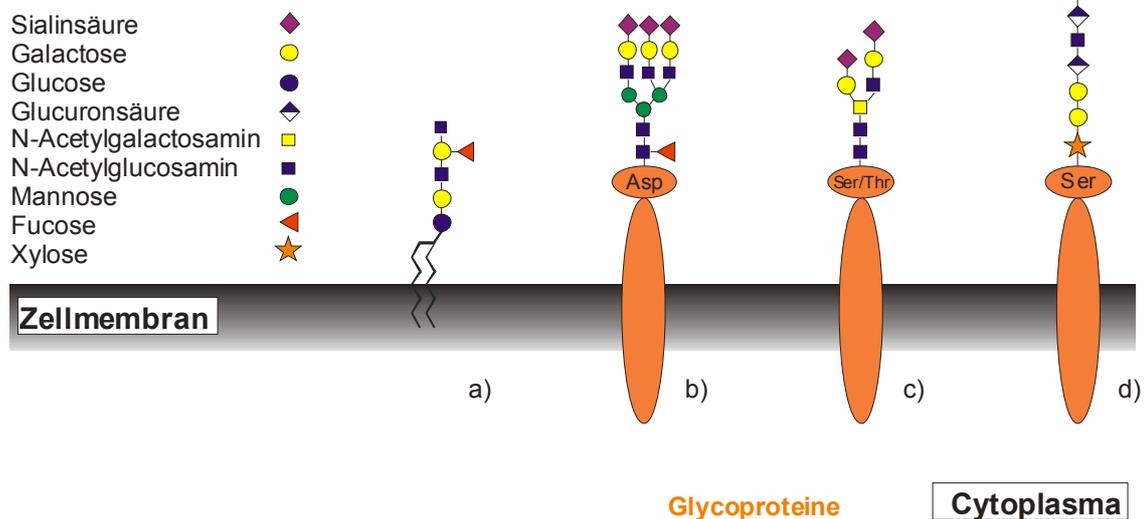


Abb. 2 N- und O-Glykosylierung

a) Glykosphingolipid am Beispiel des Blutgruppenantigens auf Zelloberflächen für die Blutgruppe A, b) N-Glykosylierung im ER, c) O-Glykosylierung (Mucintyp) im Golgiapparat, d) Proteoglykan am Beispiel des Heparins. Bei N- und O-Glykosylierungen steht am Ende der Oligosaccharide oft die Sialinsäure (siehe Abb. 2b und 2c).

3.3 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, wie es bei knockout Mäusen gezeigt werden konnte (Ioffe *et al.* 1996). Die bislang identifizierten Formen im Komplex der CDG wurden 1999 in zwei Gruppen, CDG I und CDG II, unterteilt. 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 Asparagins 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 Defekt in der Phosphomanno-Isomerase und CDG Ic einen Defekt in der α -1,3-Glucosyltransferase. Vor einigen Jahren wurde eine neue Form des CDG II (CDG IIc) gefunden, dem eine vermutlich partielle Inaktivierung des GDP-Fucose-Transporters zugrunde liegt. Genauer gesagt gibt es zwei Arten von Patienten, die Punktmutationen an zwei verschiedenen konservierten Regionen des Fucose-Transporters aufweisen. Die Symptomatik unterscheidet sich in ihrem Schweregrad. Und nur bei einem Patienten ließen sich die Auswirkungen durch orale Gabe von Fucose verbessern, bei den anderen beiden Patienten ergab sich keine Verbesserung der Symptome (Lübke *et al.* 1999 und 2001).

Die Symptomatik dieser Krankheitsbilder ist sehr vielfältig. Es treten immer schwere Schädigungen des Nervensystems, begleitet von motorischer und geistiger Behinderung auf, bei fast allen Patienten ist auch das Immunsystem betroffen.

3.4 Nucleotid-Zucker-Transporter (NST)

3.4.1 Die Funktion der NST-Transporterproteine

Durch die Topologie der mehrfach die Membran durchspannenden Transmembrandomänen sind die Transporterproteine sehr hydrophob und somit schwer zu kristallisieren. Der Maus CMP-Sia-Transporter ist bisher der einzige Nucleotid-Zucker-Transporter (NST), dessen Transmembrandomänen (TMD) vollständig untersucht worden sind. Dabei wurde gezeigt, dass er 10 TMD hat und dass sowohl das N-terminale Ende, wie auch das C-terminale Ende auf der cytosolischen Seite der Golgimembran positioniert sind (Eckhard *et al.* 1999). Letzteres scheint ein allgemeingültiges Prinzip bei den Transporterproteinen zu sein, und führt zwangsläufig zu einer geraden Anzahl von Transmembrandomänen. Eine Struktur, bei der ein Protein mehrfach die Membran durchspannt und sowohl das C-terminale, als auch das N-terminale Ende auf der gleichen Seite der Membran stehen, bezeichnet man als Typ-III Membranprotein.

Die Organisation als Homodimer ist bisher am humanen Golgi GDP-Fuc-Transporter, dem Ratten UDP-GalNAc-Transporter (Puglielli *et al.* 1999), dem GDP-Fuc-Transporter (Puglielli und Hirschberg 1999) und dem Hefe-Golgi GDP-Man-Transporter gezeigt worden (Abe *et al.* 1999). Die Homodimerstruktur erlaubt die Anordnung als Membran durchspannende Kanäle, obwohl diese Eigenschaft noch nicht bei allen NST gezeigt werden konnte. Es gibt weiterhin einen Hinweis auf einen hexameren Komplex im *Leishmania* GDP-Man-Transporter (Hong *et al.* 2000).

Die meisten Informationen über die Struktur-Funktionsbeziehungen kommen durch Daten über Chimären zwischen UDP-Gal- und CMP-Sia-Transportern (Aoki *et al.* 1999 und 2003) was zeigt, dass verschiedene Transmembrandomänen in die Substraterkennung involviert sind. So kann eine Chimäre sowohl UDP-Gal als auch CMP-Sia transportieren (Aoki *et al.* 1999, 2001 und 2003). Die Substratspezifität in Bezug auf die Base des Nucleotid-Zuckers ist hoch. Bisher wurde noch kein Transporter gefunden, der sowohl UDP- als auch GDP-gebundene Zucker zu transportieren vermag, wie es für den strukturellen Unterschied zwischen Purinen und Pyrimidinen zu erwarten war. Der Einfluss der Base bei der Erkennung des Substrates ist für den CMP-Sia-Transporter klar gezeigt worden, der streng zwischen Nucleotiden unterscheidet (Capasso und Hirschberg, 1984).

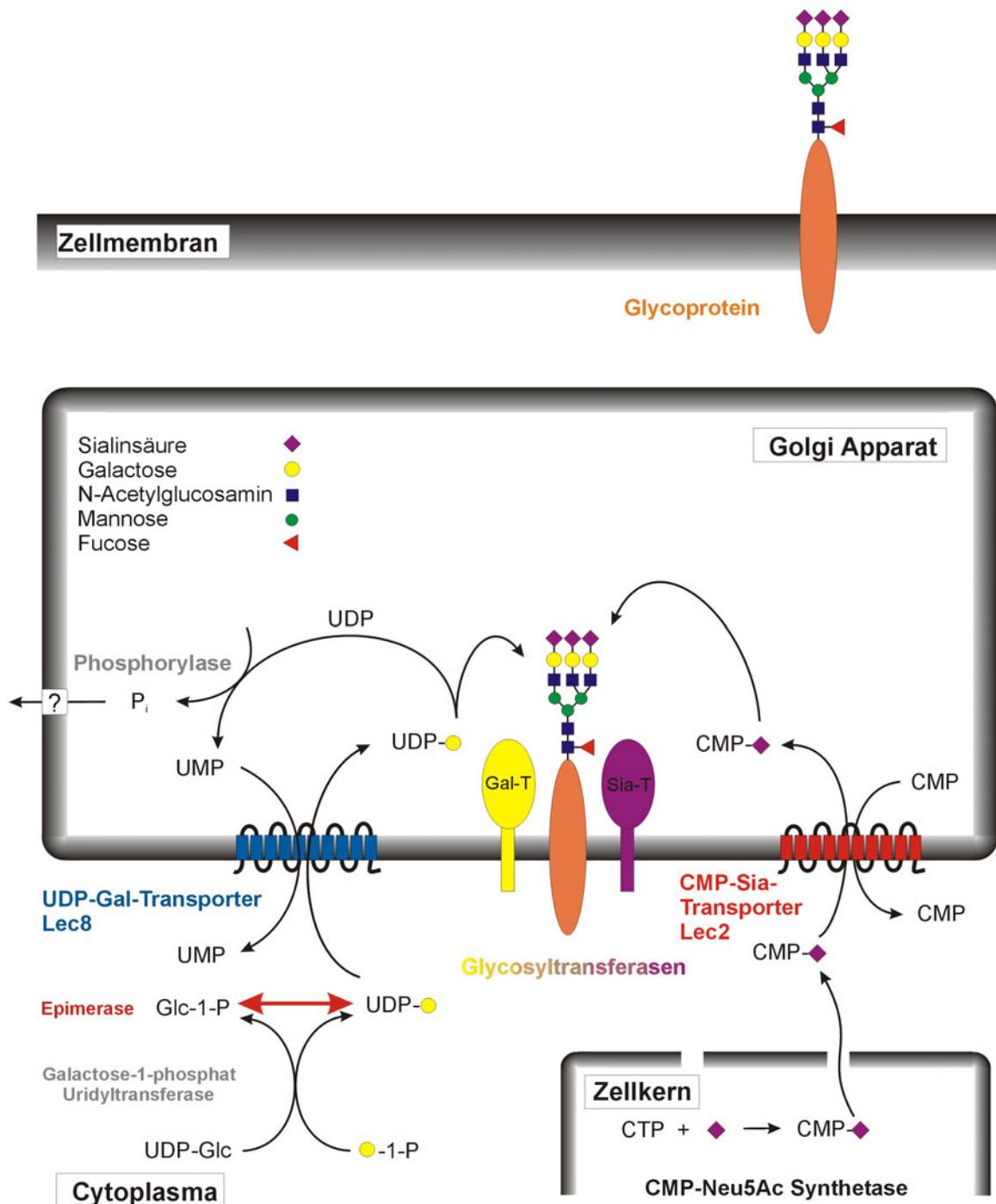


Abb. 3 Der Weg der Galactose im Golgiapparat

Synthese und Aktivierung der Galactose erfolgen im Cytoplasma, von wo die UDP-Galactose dann über Transporter in den Golgiapparat transportiert wird. Im Golgi erfolgt durch Galactosyltransferasen die Biosynthese der Glykanstrukturen, die dann auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

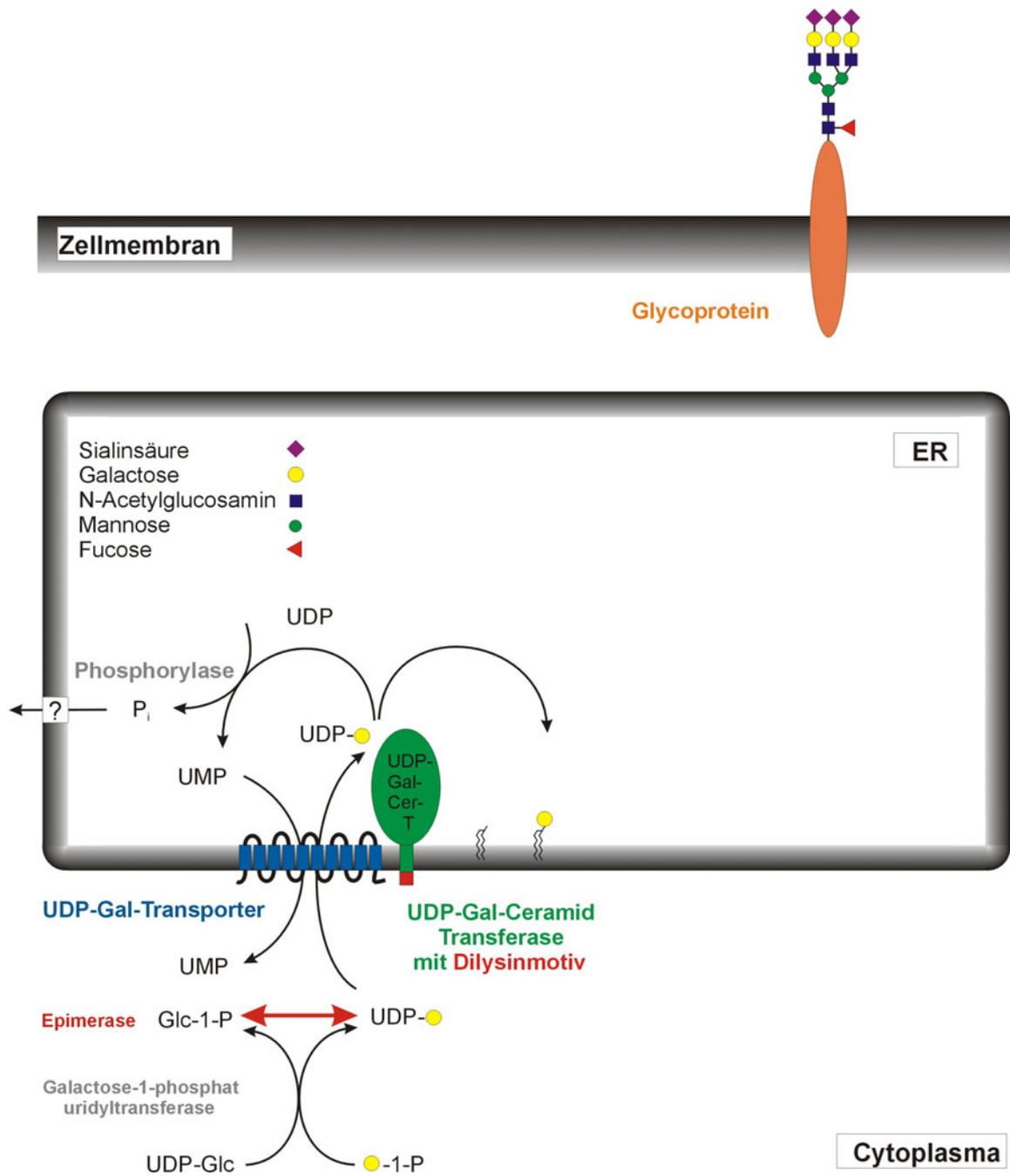


Abb. 4 Der Weg der Galactose im ER

Statt auf Polyglucane kann die Galactose im ER durch membranständige UDP-Gal-Ceramid Transferasen auf ebenfalls membranständiges Ceramid übertragen werden. Aber dafür sind UDP-Gal-Transporter auch im ER notwendig.

3.4.2 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 cDNA-Banken oder einzelne DNA-Konstrukte in die Zellen transfiziert. Über die Korrektur des Defektes der verwendeten Komplementationsgruppe konnten einzelne an der Glykosylierung beteiligte Faktoren isoliert werden.

3.4.3 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). 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. In parallelen Ansätzen wurden weitere Transporter durch proteinbiochemische 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 potenzieller Zucker-Nukleotid-Transportersequenzen identifiziert (Gerardy-Schahn *et al.* 2000; Berninsone *et al.* 2000).

3.4.4 Die Klonierung des UDP-Galactose-Transporters

Grundlage für die Isolierung des Humanen UDP-Galactose-Transporters waren Had-1-Zellen (Miura *et al.* 1996). 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 cDNA-Bank in Had-1-Zellen isoliert (Miura *et al.* 1996). 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). 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.

3.4.5 Die Polysialinsäure

Die Polysialinsäure (PSA) ist ein lineares Homopolymer aus α -2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren (Rougon, 1993). In Vertebraten ist die PSA eine dynamisch regulierte posttranslationale Modifikation. Die PSA ist 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* der Serogruppe B bildet die PSA das Kapselpolysaccharid. Das gleichzeitige Auftreten von PSA als Kapselpolysaccharid bei Bakterien und als körpereigene Struktur der Vertebraten 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 von

Endoneuraminidasen (z.B. Endo NE oder Endo NF) PSA-Ketten ab einer Länge von acht Resten spezifisch geschnitten werden. Nach dem Verdau mit Endoneuraminidasen kann der Antikörper 735 das PSA-Epitop z.B. auf NCAM nicht mehr erkennen.

3.4.6 Struktur der NST-Transporterproteine

Nucleotid-Zucker-Transporter (NST) stellen eine wichtige Verbindung zwischen der Synthese der Zucker im Cytoplasma und den Glykosylierungsprozessen im ER bzw. Golgiapparat dar. NST sind 320 – 400 Aminosäuren lange, hydrophobe Proteine. Sie beliefern die Glykosyltransferasen, die in die Biosynthese von Glykokonjugaten im Biosyntheseweg der Sekretion von eukaryontischen Zellen beteiligt sind, mit aktivierten Zuckern, die entweder im Cytoplasma oder im Zellkern synthetisiert werden (Hirschberg *et al.* 1998). Dieses Konzept wird durch die Tatsache unterstützt, dass die die Glykolyse betreffende Krankheit in einer Fehlfunktion dieser Transporter begründet ist.

NST sind Membranproteine vom Typ III, die die Membran 10 mal durchspannen. Eine Evolutionshypothese (Jack *et al.* 2001) schlägt vor, dass die Vorläuferproteine der 10 TMD nur vier Transmembrandomänen hatten. Durch Verdopplung der ersten TMD und Fusion der beiden neuen nun fünf TMD enthaltenden Proteine mit umgekehrter Orientierung wurde ein Membranprotein erhalten, welche die Membran 10 mal durchspannt. C- und N-Terminus befinden sich beide auf der cytosolischen Seite der Membran (Hirschberg *et al.* 1998, Perez *et al.* 1985, Ishida *et al.* 1996, Sprong *et al.* 1998). Während dieser Entwicklung sind einige hochkonservierte Domänen erhalten geblieben. Diese Hypothese ist ebenfalls für die Topologie der CMP-Sia-Transporter sowie der GDP-Fucose-Transporter anwendbar.

NST sind beteiligt am Transport von Nucleotid-Zuckern vom Cytosol in den Golgiapparat bzw. das ER durch ein temperaturabhängiges elektroneutrales Antiportersystem, bei dem der aktivierte Zucker gegen das entsprechende Monophosphatnucleotid ausgetauscht wird. Mit Ausnahme der CMP-Sialinsäure, die im Zellkern synthetisiert wird, werden alle anderen aktivierten Zuckernucleotide im Cytoplasma synthetisiert. Uridintriphosphat (UTP) ist das wichtigste Nucleotid um Zucker zu aktivieren. Abb. 4 zeigt die Synthese von UDP-Galactose über Glucose-1-Phosphat. Für diesen Weg braucht die Zelle allerdings Galactose. Mit Hilfe einer Epimerase kann die Zelle aber auch direkt Galactose aus Glucose herstellen. Dieser Weg ist hier nicht dargestellt.

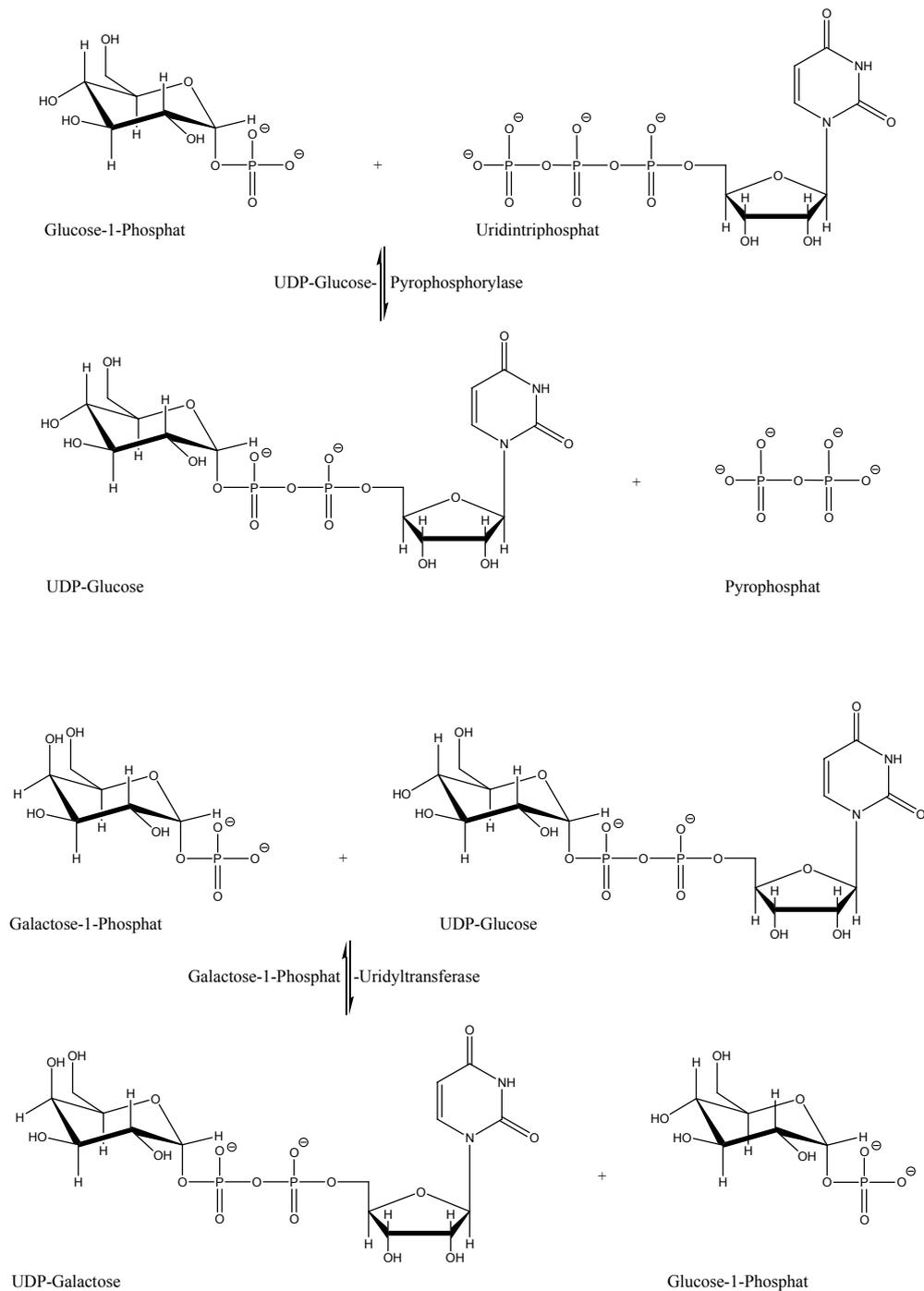


Abb. 5 Die Aktivierung der Galactose

Darstellung der Aktivierung von Galactose in zwei Schritten über die Aktivierung der Glucose und Übertragung auf Galactose-1-phosphat. Zuerst wird Glucose-1-phosphat durch UTP aktiviert. Das Nucleotid wird von der aktivierten UDP-Glucose auf Galactose-1-Phosphat übertragen und es entsteht UDP-Galactose. Glucose-1-phosphat kann in den Citratcyclus eingeschleust werden, oder für weitere Aktivierungen zur Verfügung stehen. UDP-Galactose wird durch den UDP-Gal-Transporter in den Golgiapparat oder das ER transportiert, um für die Glykosylierungen verwendet zu werden.

3.4.7 Die Familie der NST-Transporterproteine

Die Nukleotid-Zucker-Familie (*solute carrier family SLC 35*) umfasst mittlerweile 28 Mitglieder und kann aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in 6 Unterfamilien eingeteilt werden. Die Unterfamilie 35A umfasst die CMP-Sia-, UDP-Gal- und den UDP-GlcNAc-Transporter. Repräsentative Mitglieder der Untergruppen 35B, 35C und 35D sind der *K. lactis* UDP-GlcNAc, der UDP-Gal-Trel1, der GDP-Fuc-Transporter und der UDP-GalTrel7. Von den Gruppen 35E und 35F sind bisher noch keine Transporter identifiziert worden. Sowohl der N- und C-terminale cytosolische Bereich können ohne Beeinflussung der Aktivität oder Lokalisierung entfernt werden (Deutscher *et al.* 1986, Sprong *et al.* 2003).

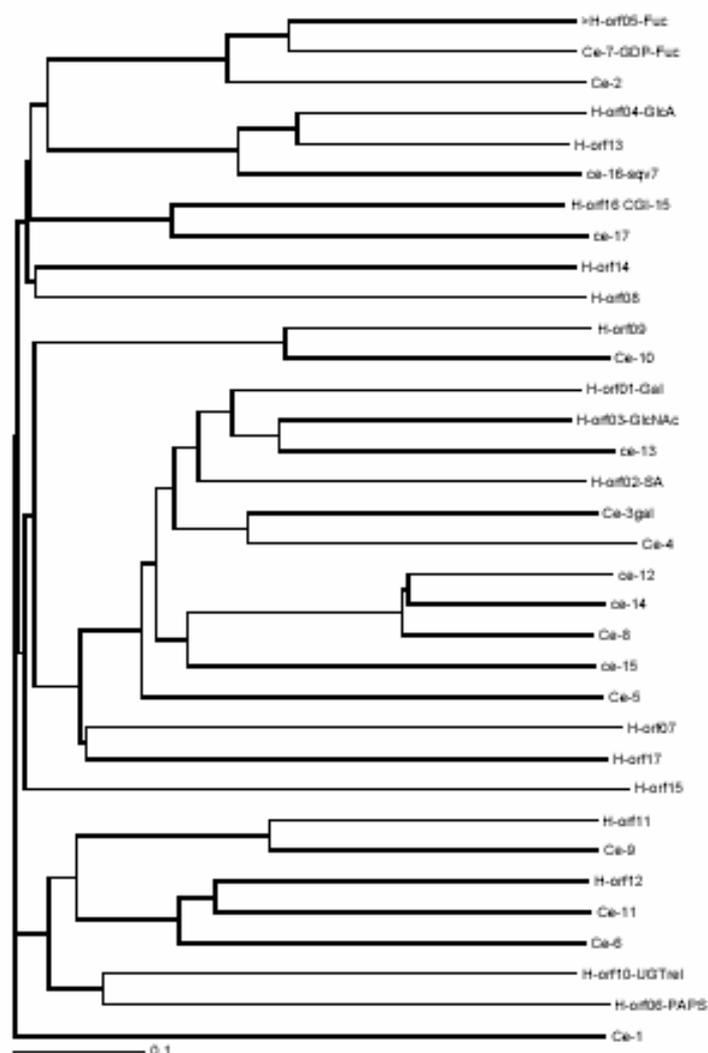


Abb. 6 Dendrogramm der NST Familie

Aufgrund der Sequenzunterschiede bzw. Ähnlichkeiten in den konservierten Regionen ist hier eine Karte der evolutionären Verwandtschaft in Abhängigkeit von der Spezies und dem transportierten Substrat dargestellt. Der Maßstab am unteren Rand zeigt die evolutionäre Distanz für die Sequenzen aus *C. elegans* und Mensch.

Tab. 1 Die Familie der NST mit den bisher bekannten Substraten

Name des Gens	transportiertes Substrat	Literatur
SLC35A1	CMP-Sialinsäure	Eckhardt <i>et al.</i> 1996
SLC35A2	UDP-Gal/GalNAc	Miura <i>et al.</i> 1996 Segawa <i>et al.</i> 2002
SLC35A3	UDP-GlcNAc	Guillen <i>et al.</i> 1998
SLC35A4		
SLC35A5		
SLC35B1		
SLC35B2	PAPS	Luders <i>et al.</i> 2003 Kamiyama <i>et al.</i> 2003
SLC35B3		
SLC35B4	UDP-Xyl/GlcNAc	Ashikov <i>et al.</i> 2005
SLC35C1	GDP-Fuc	Lübke <i>et al.</i> 2001 Lühn <i>et al.</i> 2001
SLC35C2		
SLC35D1	UDP-GlcA/GlcNAc	Murao <i>et al.</i> 2001
SLC35D2	multispezifischer Transporter	Suda <i>et al.</i> 2004 Ishida <i>et al.</i> 2005
SLC35D3		
SLC35E1		
SLC35E2		
SLC35E3		
SLC35E4		
SLC35F1		
SLC35F2		
SLC35F3		
SLC35F4		
SLC35F5		
SLC35F6 (C2ORF18)		
SLC35G1 (TMEM22)		
SLC35G2 (AMAC1)		
SLC35G3 (AMAC1L1)		
SLC35G4 (TMEM20)		

3.5 Der UDP-Galactose Transporter

Der UDP-Gal-Transporter ist ein Transmembranprotein des Golgiapparates (Hirschberg *et al.* 1998, Perez *et al.* 1985), der die im Cytoplasma synthetisierte UDP-Galactose in den Golgiapparat transportiert. Dort werden verschiedene Galactosetransferasen, die auf der Innenseite der Golgimembran sitzen, mit Galactose versorgt, die die Zuckerketten für die Präsentation an der Zelloberfläche aufbauen (Kawakita *et al.* 1998). Zelllinien, bei denen dieser Transporter defekt ist, können nur Glykosylceramid statt Lactosylceramid aufbauen (Taki *et al.* 1991), und die Zuckerketten enden bei GlcNAc (Hara *et al.* 1989).

Nachdem der UDP-Galactose-Transporter kloniert worden ist, hat man ihn auch im Golgi lokalisiert nachgewiesen (Yoshioka *et al.* 1997, Ishida *et al.* 1996). Allerdings haben Sprong *et al.* 1998 in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass die ER-ständige Ceramide-Galactosyltransferase (Cer-GalT) inaktiv ist, wenn sie in CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec8 mit einem genetischen Defekt im UDP-Gal-Transporterprotein exprimiert wird (Deutscher *et al.* 1986). Der Funktionsverlust konnte durch Kotransfektion der UDP-Gal-cDNA komplementiert werden (Sprong *et al.* 1998), was klar zeigt, dass der Mangel an Substrat im ER die Enzymaktivität verhindert. Die gleiche Gruppe hat inzwischen gezeigt, dass Cer-GalT in der Lage ist, einen Komplex mit dem UDP-Gal Transporter zu machen und diesen daher im ER zurückhält (Sprong *et al.* 2003).

Gal-Transferasen benötigen also für die Synthese der Oligosaccharide UDP-Galactose, die von den UDP-Gal-Transportern zur Verfügung gestellt werden. Zellen mit defektem UDP-Gal-Transporter zeigen deutliche Abweichungen in den Strukturen der Glykoproteinen und Glykolipiden der Zelloberfläche. Als Ergebnis der deutlichen Reduktion der Galactosylierung ergeben sich starke Verkürzungen der Ketten, eine Verminderung der sialylierten Verbindungen und ein Anstieg der endständigen *N*-Acetylglucosamin Gruppen. Außer den 17 potenziellen humanen NST-Zucker-Transportern sind bisher auch weitere Transporter in anderen Spezies identifiziert worden; 15 in *Drosophila melanogaster*, 8 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, 17 in *Caenorhabditis elegans* und 40 in *Arabidopsis thaliana*.

3.5.1 Der UGT1 und der UGT2

Die Struktur des UDP-Gal-Transporters, die aus der cDNA-Sequenz vorausgesagt worden ist, ähnelt der Struktur der anderen Nucleotid-Zucker-Transporter. Den humanen UDP-

Gal-Transporter gibt es in zwei Isoformen, den UGT1 und den UGT2 (Ishida *et al.* 1996, Miura *et al.* 1996). Sie sind 393 bzw. 396 Aminosäuren lang und unterscheiden sich nur im C-terminalen Teil. Die fünf letzten Aminosäuren des UGT1 sind durch 8 andere Aminosäuren beim UGT2 ersetzt. Beide Isoformen werden durch das gleiche Gen codiert und durch alternatives Spleißen exprimiert. Beide Isoformen komplementieren den defekten UGT-Phenotyp. Northern-blot-Analysen haben ergeben, dass sowohl UGT1 als auch UGT2 in allen Geweben exprimiert wurden, die bisher untersucht worden sind (Ishida, unveröffentlichte Daten).

Die Existenz einer alternativen Spleißvariante im Gen des humanen UDP-Gal-Transporters ermöglicht die Translation zweier unterschiedlicher Proteine (Ishida *et al.* 1996). Wie in den Abbildungen 6 und 7 gezeigt, führt die Translation der längeren Variante zum UGT1 mit der C-terminalen Sequenz SVLVK, während die Translation der kürzeren mRNA zum UGT2 führt, indem die Sequenz SVLVK durch die Sequenz LLTKVKGS ersetzt ist. Der UGT2 enthält also ein Dilysin-Motiv, das wie auch in anderen Proteinen gezeigt Proteine im ER zurück hält. Die Experimente in dieser Arbeit zeigen schlüssig, dass das Dilysin-Motiv, welches der UGT2 enthält, ein eigenständiges ER-Rückhaltesignal darstellt.

3.5.2 Lokalisierung

Die meisten Glykosyltransferasen, die Nukleotid-aktivierte Zucker verwenden, sind im Golgi lokalisiert, während die Mehrheit der ER-ständigen Glykosyltransferasen die aktivierten Zucker über Dolicholphosphat erhalten (Burda *et al.* 1999). Folglich sollte Nukleotid-Zucker Transportaktivität in Präparationen der Golgimembranen gemessen werden (Hirschberg *et al.* 1998, Sommers *et al.* 1982, Capasso *et al.* 1994). Nach der Klonierung kann der entsprechende Transporter auch in der Golgimembran lokalisiert werden (Yoshioka *et al.* 1997, Lühn *et al.* 2001, Ishida *et al.* 1999, Eckhardt *et al.* 1996, Dean *et al.* 1997). Einen Transport bestimmter Nukleotid-Zucker ins ER muss es jedoch geben, da es im ER eine Reihe von Nukleotid-Zucker benötigender Glykosylierungsreaktionen gibt. Die UDP-Glucose Glykosyltransferase (Zuber *et al.* 2001) benötigt einen Nukleotid-Zucker als Substrat. Die Donorsubstrate, die man bisher im humanen ER entdeckt hat sind UDP-GlcA, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Xylose, und UDP-Glucose. Ihre Anwesenheit legt die Existenz eines entsprechenden Transportersystems auch im ER nahe (Hirschberg *et al.* 1998). Es gibt Beweise dafür, dass die Proteoglykanbiosynthese im ER gestartet wird (Kearns *et al.* 1993). Weiterhin sind einige

Mitglieder der UDP-Glykosyl-Transferase Gen-Superfamilie (Mackenzie *et al.* 1997) in die Glykosylierung lipophiler Verbindungen involviert, die im ER lokalisiert sind (Meech *et al.* 1997, de Wildt *et al.* 1999). Tatsächlich konnte in Übereinstimmung mit diesen Daten Nukleotid- Zucker-Transportaktivität in ER-Vesikeln gemessen werden (Hirschberg *et al.* 1998, Castro *et al.* 1999, Bossuyt *et al.* 1997. Durch Immunfärbungen konnte der Hefe UDP-N-acetylglucosamintransporter (Roy *et al.* 2000), der hUDP-Glucuronsäuretransporter und der hUDP-N-acetyl-glucosamintransporter (Muraoka *et al.* 2001) im ER lokalisiert werden. Interessanterweise hat der Hefe UDP-N-Acetylglucosamintransporter ein C-terminales Dilysin-Motiv (Zerangue *et al.* 2001, Nilson *et al.* 1989), welches möglicherweise für die Lokalisierung bzw. den Rückhalt im ER verantwortlich ist.

3.5.3 Das ER-Rückhaltesignal

ER-Rückhaltesignale verleihen einem Protein ein Signal für einen bestimmten Bestimmungsort. Ihre Funktion entfalten sie nur in einer bestimmten Position im Protein. Bei Zerstörung des Signals z.B. durch eine Punktmutation, wird das Protein nicht richtig lokalisiert bzw. bei Übertragung auf ein anderes Protein wird dieses falsch lokalisiert (Teasdale und Jackson, 1996). Dies ist von Interesse, wenn ein nicht ER-ständiges Protein im ER fehllokalisiert wird, wie das am Beispiel des Alzheimer *amyloid precursor fragment* C99 gezeigt wird (Maltese *et al.* 2001). Das Dilysin-Motiv (KKxx oder KxKxx) ist am C-terminalen Ende des Transporterproteins am Position -3 bis -5 lokalisiert und steuert das Zurückhalten im ER von Proteinen, die im Golgi lokalisiert sind. Das Motiv wird durch mindestens fünf Aminosäuren zwischen der ersten geladenen Aminosäure des cytosolischen Teils des Proteins und dem -3 Lysin getrennt.

In einer weiteren Studie wurden Chimären 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. In weiteren Studien wurden Transmembrandomänen der beiden Transporter ausgetauscht. In den meisten Fällen waren die entstandenen Chimären entweder für Galactose oder für Sialinsäure aktiv. Einige der Chimären, die sich aus unterschiedlichen Segmenten der beiden Transporter zusammensetzte, zeigte allerdings Transportaktivität für beide Substrate. Aus der Kombination der Segmente dieser bifunktionellen Chimären schlossen die Autoren auf die Bedeutung dieser Domänen für die Substratspezifität der Bindung oder den Transport der Substrate (Aoki *et al.* 2001).

3.5.4 Die genomische Organisation des UDP-Gal-Transporters

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. Mit Hilfe der genomischen Sequenzinformation konnte auch die 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 (Abb. 7). Wurde diese Konsensussequenz nicht genutzt bzw. wurde die RNA an dieser Stelle nicht „gespleißt“, so entstand der humane UGT in seiner Isoform 1. Wurde die Konsensussequenz in Exon 4 genutzt und wurde die mRNA an dieser Stelle „gespleißt“, 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 (Abb. 7). Das alternative „Spleißen“ 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.

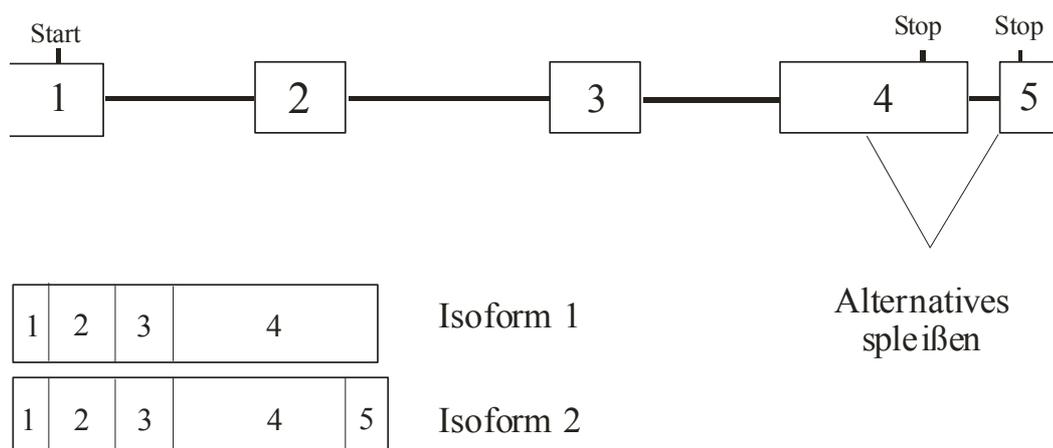


Abb. 7 Schematische Darstellung der genomischen Organisation des humanen UGT, abgeleitet von der veröffentlichten genomischen DNA Sequenz (GeneBank Nr. AF207550) mit schematischer Darstellung der durch alternative Prozessierung verursachten zwei Isoformen für den humanen UGT.

1	ATGGCAGCGGTTGGGGCTGGTGGTTCCACCGCGGCCCGGGCCAGGGGCGGTTTCCGCGGGTGCATTG	69
1	M A A V G A G G S T A A P G P G A V S A G A L	23
70	GAGCCGGGGACCGCCAGTGC GGCTCACAGGCGCCTGAAGTACATATCCCTAGCTGTGCTGGTGGTCCAG	138
24	E P G T A S A A H R R L K Y I S L A V L V V Q	46
139	AATGCCTCCCTCATCCTCAGCATCCGCTACGCCCGCACGTTGCCAGGGGACCGCTTCTTTGCCACCACT	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	GCTGTGGTCATGGCGGAAGTGCTCAAAGGTCTCACCTGCCTGCTGCTGCTCTTCGCACAGAAGAGGGGT	276
70	A V V M A E V L K G L T C L L L L F A Q K R G	92
277	AACGTGAAGCACCTGGTTCTCTTCCCTCCATGAGGCTGTCTGGTGCAGTATGTGGACACGCTCAAGCTC	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	GCAGTGCCTCTCTCATCTACACCTTGCAGAATAACCTCCAGTATGTTGCCATCTCTAACCTACCAGCT	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	GCCACTTTCCAGGTGACATAACCAGCTGAAGATCCTGACCACAGCGTGTCTCCGTGCTCATGCTGAAT	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	CGCAGCCTTTCCCGGCTGCAGTGGGCTCCCTGCTGCTCCTCTTCACTGGCGTCGCCATGTCCAGGCA	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	CAGCAAGCCGGTGGGGGAGGCCACGCCACTGGATCAGAACCCTGGGGCAGGCCTGGCAGCCGTCGTG	621
185	Q Q A G G G P R P L D Q N P G A G L A A V V	207
622	GCCTCTGTCTCTCTCCGGCTTCGAGGTGTCTACTTTGAGAAGATCCTCAAAGGCAGCTCAGGCTCC	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	GTGTGGCTGCGCAACCTGCAACTGGGCTCTTCGGCACAGCACTGGGCTGGTGGGGCTCTGGTGGGCT	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	GAGGTACCGCCGTGGCCACCCGTGGTTCTTTTTGGGTACACACCTGCTGTCTGGGGCGTGGTGTCTC	828
254	E G T A V A T R G F F F G Y T P A V W G V V L	276
829	AACCAGGCCTTCGGCGGGCTACTGGTGGCTGTGGTTGTCAAGTACGCTGACAATATCCTCAAGGGCTTT	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	GCCACCTCCCTGTCCATTGTGCTGTCCACTGTTGCCTCCATTGCCTCTTTGGCTTCCACGTGGACCCA	967
300	A T S L S I V L S T V A S I R L F G F H V D P	322
967	TTATTTGCCCTTGGCGCTGGACTCGTCATTGGTGTGCTCTACCTCTACAGCCTTCCCGAGGTGCAGCC	1035
323	L F A L G A G L V I G A V Y L Y S L P R G A A	345
1036	AAAGCCATAGCCTCTGCCTCTGCCTCCGCTCCGGGCCCTGCGTTCACCAGCAGCCTCCCGGGCAGCCA	1104
346	K A I A S A S A S A S G P C V H Q Q P P G Q P	368
1105	CCACCACCGCAGCTGTCTTCCACCGTGGAGACCTCATCACGGAGCCCTTTCTGCCAAAGTTGCTCACC	1173
346	P P P Q L S S H R G D L I T E P F L P K L L T	391
1174	AAGGTGAAGGGTTCTTAG	1191
392	K V K G S .	397

Abb. 8 Die DNA-Sequenz des hUGT1 und des hUGT2

Offenes Leseraster und Proteinsequenz des humanen UGT. Start- und Terminationskodon sind eingerahmt. Das Dilysin-Signal ist grau hinterlegt. Die Sequenzen des hUGT1 und des hUGT2 unterscheiden sich nur unmittelbar am C-terminalen Ende ab Position 1164. Zum Vergleich sind die unterschiedlichen Sequenzen aufgeführt.

hUGT1 (*short form*) SVLVK
hUGT2 (*long form*) LLTKVKGS

3.6 *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein Vertreter der Rhabditiden, der in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Entwicklungsbiologie und der Genetik zu einem beliebten Modellorganismus geworden ist. Seit er in den 1960'er Jahren als Modellorganismus eingeführt worden ist, ist seine Beliebtheit stetig gestiegen.

Heute stellt er neben dem Bakterium *Escherichia coli*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* den am besten erforschten Organismus der Welt dar. *Caenorhabditis elegans* war 1998 der erste vollständig sequenzierte Vielzeller überhaupt. 2003 wurde auch das Erbgut der nahe verwandten Art *Caenorhabditis briggsae* vollständig entschlüsselt, um Vergleichsmöglichkeiten nahe verwandter Arten zu schaffen.

Durch Computer gestützten Sequenzvergleich von Genen des *C. elegans* gelang es, alle 17 möglichen die Membran durchspannenden homologen Gene vom Typ III zu identifizieren, die potenzielle Zuckertransporterproteine codieren (D. Vestweber).

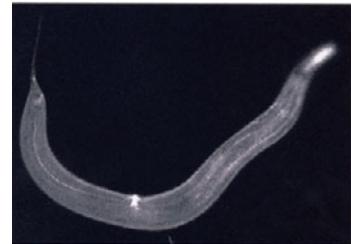


Abb. 9 Der Fadenwurm *C. elegans*

3.7 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung des Dilysin-Motifs auf Aktivität und Lokalisierung des Hamster-UDP-Galactose-Transporters, eines Faktors der in den Biosyntheseweg zum Aufbau komplexer N-Glykanstrukturen involviert ist. Mutationen sollten auf ihre Bedeutung für die Aktivität und subzelluläre Lokalisierung des Hamster UGT und anderer, verwandter Nukleotid-Zucker-Transporter untersucht werden. Die Wirkung der beiden Spleißvarianten der beiden humanen UGT1 und UGT2 auf die Lokalisierung sollte untersucht werden, indem das Dilysin-Motiv auf einen anderen Transporter übertragen wurde, bzw. ein künstliches ER-Signal generiert wurde.

In weiteren Studien sollte die Substratspezifität am Beispiel der verschiedenen potenziellen Transporterproteine des Fadenwurms *C. elegans* für Galactose geprüft werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Blotkammer Fast-Blot B44	Biometra
Brutschränke	Heraeus
Digitaler Scanner HP ScanJet 4P	Hewlett Packard
373 DNA Sequencer	Applied Biosystems
Easy Enhanced Analysis System (E.A.S.Y. RH-3, Videokamera 429K)	Herolab
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Hoefer
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Peqlab
Elektrophoresekammern für SDS-Page	Biometra
FACS-Gerät FACScan	Becton Dickinson
GeneAmp PCR System 2400	PE Biosystems
Glasgeräte	Schott
Heizblock Modell 583	Grant
Heizschüttler	Edmund Bühler
Hybridisierungsöfen	Heraeus
Mikrowelle R-233	Sharp
MiniGel-Elektrophoresekammer	Biometra
Ph-Meter 766 Calimatic	Knick
Photometer, Ultraspec III	Amersham Pharmacia Biotech
Reinstwasseranlage (ddH ₂ O)	Barnstead
Sequencing Gel Electrophoresis System Model S2	GibcoBRL
Spannungsgerät: Standard Power Pack P25	Biometra
SpeedVac-Concentrator RVC 2-18	Christ
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus
Thermoblock TB1	Biometra
Thermocycler T1 und T Gradient	Biometra
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultra-Mikro-Quarzküvette 105.202-QS (10 mm; 70 µl)	Hellma
UV-Tisch UVT-20 LE	Herolab
UV-Stratalinker	Stratagene
Vakuumpumpe	Ilmvac

Vortex Genie2	Scientific Industries
WaageCP 224S (μg) und CP 3202 (g)	Sartorius
Wipptische	Biometra
Zentrifugen :	
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Tischzentrifuge 5415C	Heraeus
Ultrazentrifuge Coulter Avanti J-301	Beckmann
Kühlzentrifuge Modell J2-21	Beckmann
Minifuge T	Heraeus, Sepatech
Centrikon T-1170	Kontron
Rotoren	
JA 25.50	Beckmann
JLA 10.500	Beckmann
JS-24.15	Beckmann
Zentrifugenbecher (50 ml; 250 ml, 500 ml)	Nalgene
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Beckmann
Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (\varnothing 12 mm)	Jürgens
Einmal-Injektionskanülen (\varnothing 0,8 mm)	Braun
Filterpapier 3 MM	Whatman
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech
Kryoröhrchen	Corning
Millex GV Filter (0,22 μm steril)	Millipore
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

4.1.3 Chemikalien

Aceton	Riedel de Haën
Acrylamid 40% (37,5:1)	Applichem
Acrylamid 40% (29:1)	Roth
Acrylamid 40% (19:1)	GibcoBRL
Agarose	GibcoBRL
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Ampicillin Natriumsalz (Binotal)	Bayer/Serva
β -Mercaptoethanol	Merck
BCIP Alkaline Phosphatase chromogen kit (BCIP/NBT)	
Blockierungsreagenz	Roche
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Fluka/Roth
Rinderserumalbumin (BSA; Fraktion V)	Applichem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Carbenicillin, Dinatriumsalz	FLUKA
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
Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (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
Saponin		Sigma
N, N, N', N'-Tetraethylendiamin (TEMED)		Serva
Aprotinin		Bayer
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)		Serva
Triton X-100		Fluka
Trypanblau		Sigma
Tween 20	Dodecylsäure 2-[2-[3,4-bis(2-hydroxyethoxy)tetrahydrofuran -2-yl]-2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl ester	Fluka
X-Gal		Roth/Gibco

4.1.4 Nährmedien, Puffer 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
Ampicillin Natriumsalz	SERVA
Carbenicillin, Dinatriumsalz	FLUKA
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml (Pen.) bzw. 5000 μ g/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
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_2HPO_4 Einstellen mit 1 M NaH_2PO_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)
2x GEBS	50 mM EDTA, pH 8,0 20 % Glycerol 0,5 % Sarkosyl 0,25 % Bromphenolblau
2x Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % Glycerol 5 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau
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
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin 0,1% SDS
Western Blotpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin

4.1.5 Zelllinien

CHO K1 (C6)	Hamster-Ovarien-Zelllinie, ATCC CCL 61, Subklon C6 (Dr. M. Eckhardt)
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
CHOP8	Hamster-Ovarien-Zelllinie aus der Komplementationsgruppe Lec8 (CHO K1-Zellen mit einem Defekt im UDP-Galactose-Transportsystem).

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.

4.1.6 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 <i>et al</i> 1983)
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (lac-proAB) [F' <i>traD36</i> proAB lacI ^q Z Δ M15]
XL1-blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> lac [F' <i>proAB</i> lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]

4.1.7 Plasmide/Vektoren

pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor (2958) bp und prokaryontischer Expressionsvektor mit β -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz,(Stratagene)
pcDNA3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen) 5,4 kb
pEVRF0-HA	Eukaryontischer Expressionsvektor (Matthias <i>et al.</i> 1989) pME8.1 <i>Hind</i> III-Fragment aus pFLAGME8 in pcDNA3
pCMVlacZ	β -Galactosidasegen hinter CMV-Promotor
YES2	Expressionsvektor (Invitrogen)

4.1.8 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
TV5reverse	TAGGTGACACTATAGAATAC
329 (T3)	ACCATGATTACGCCAAGC

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

HA _{sense}	<u>GATCCTACCCTTATGACGTCCCGATTACGCCAGCCTGG</u>
HA _{anti}	<u>CTAGCCAGGCTGGCGTAATCGGGGACGTCATAAGGGTAG</u>

Oligonukleotide zur Sequenzierung des Hamster UDP-Galactose Transporters:

SO005	CTGTTCTCCGTGCTCATG
SO008	GTTGTAGTCAAGTACGC
SO013	GTAGAGGTAGACGGCAC
SO015	CGGTTCAACATGAGCAC
SO049	GTGTCACCTGTCTCCTG
SO134	CATTTTATTTGCAGAACTTACC
SO135	GACAGTCGGTCGGTG

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

SO001	G <u>CGGATCCG</u> CAGCGGTTGGGGCTGGTGG	5'- <i>Eco</i> R I
SO002	G <u>CGGATCC</u> CCTTACCAGCACTGACTTTGG	3'- <i>Xba</i> I

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

SO018	G <u>CGGATCC</u> GCAGCGGTTGGGGTTGGCGG	5'- <i>Bam</i> H I
SO019	G <u>CGGATCCC</u> GAACCCTTCACCTTGGTGAGC	3'- <i>Bam</i> H I
SO023	G <u>CGAATTC</u> GCAGCGGTTGGGGTTG	5'- <i>Eco</i> R I
SO024	CG <u>TCTAGACT</u> ACGAACCCTTCAC	3'- <i>Xba</i> I (Stop)

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

ME41	G <u>CGGATCC</u> ATGGCTCCGGCGAGAG	5'- <i>Bam</i> H I
ME42	G <u>CGGATCCC</u> CACACCAATGATTCTCTCTTTT	3'- <i>Bam</i> H I
ME71	G <u>CGAATTC</u> GCTCAGGCGAGAGAA	5'- <i>Eco</i> R I
ME72	G <u>TCTAGATC</u> CACACACCAATGAC	3'- <i>Xba</i> I (Stop)

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

SO087	GGTTATTCTGCAAAGTAAAGATGAGAGAGG	Y122F
SO088	CCTCTCTCATCTTTACTTTGCAGAATAACC	Y122F
SO093	GGTTATTCTGCAAAGTAGCGATGAGAGAGG	Y122A
SO094	CCTCTCTCATCGCTACTTTGCAGAATAACC	Y122A
RK001	CGT CTA GAC TAC GAA CCC GCC ACC TTG GTG	K396A

Oligonukleotid zum Anhängen des Dilysin-Motivs aus dem UDP-Gal-Transporter an den CMP-Sia-Transporter.

RK002	CGT CTA GAT CAC GAA CCC TTC ACC TTC ACA CCA ATG ATT CTC TCT TTT GAA GTT GC
-------	---

Oligonukleotid zur Einführung einer *Xba* I-Schnittstelle:

SO132	CG <u>TCTAGACT</u> ACTTGGTGAGCAACTTTGGC	Δ395-398
-------	---	----------

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

RK003	GGC AGA AAG <u>GGA TCC</u> GTG ATG AGG	5'- <i>BamH</i> I
RK004	CCT CAT CAC <u>GGA TCC</u> CTT TCT GCC	3'- <i>BamH</i> I
RK005	GCT GGT GAA TGC <u>AGG ATC CAG</u> AGG CAG AGG C	5'- <i>BamH</i> I
RK006	GCC TCT GCC TCT <u>GGA TCC</u> TGC ATT CAC CAG C	3'- <i>BamH</i> I
RK007	CTG CCA AAG TTG <u>GGA TCC</u> AAG GTG AAG GG	5'- <i>BamH</i> I
RK008	CCC TTC ACC TTG <u>GAT CCC</u> AAC TTT GGC AG	3'- <i>BamH</i> I

Oligonukleotide zur Einführung von *BamH* I-Schnittstellen in die potenziellen Zucker Nukleotid Transporter ORF 3, ORF 11, ORF 14, ORF 15 und ORF 16 von *C. elegans* ein, jeweils ohne Start-ATG mit und ohne Stoppsignal.

RK009	GCG <u>GAT CCG</u> GGC TCA CAA AAG CAG AAA CC	5'- <i>BamH</i> I
RK010	GCG <u>GAT CCT</u> TAT GAT TTG CTG CTC TCG ACC	3'- <i>BamH</i> I
RK011	GCG <u>GAT CCT</u> GAT TTG CTG CTC TCG ACC AC	3'- <i>BamH</i> I
RK012	GCG <u>GAT CCG</u> CAT CGG CAG TTG CAC CG	5'- <i>BamH</i> I
RK013	GCG <u>GAT CCC</u> TAC TGT TTC TTC TTC TCA TCT TGC	3'- <i>BamH</i> I
RK014	GCG <u>GAT CCC</u> TGT TTC TTC TTC TCA TCT TGC	3'- <i>BamH</i> I
RK015	GCG <u>GAT CCA</u> GTG ATG TGA AAC ATC AAA TTT TGG	5'- <i>BamH</i> I
RK016	GCG <u>GAT CCT</u> TAA TTT TTT TCT GCG TCG CTG TCC3	3'- <i>BamH</i> I
RK017	GCG <u>GAT CCA</u> TTT TTT TCT GCG TCG CTG TCC	3'- <i>BamH</i> I
RK018	GCG <u>GAT CCA</u> GTT CAA GTG AAA ATG ACT CAA AG	5'- <i>BamH</i> I
RK019	GCG <u>GAT CCC</u> TAC TTT TCC GGT TTA ATC ATC	3'- <i>BamH</i> I
RK020	GCG <u>GAT CCC</u> TTT TCC GGT TTA ATC ATC AAA AG	3'- <i>BamH</i> I
RK021	GCG <u>GAT CCA</u> CGT CAA CAG TAC AGT CAC C	5'- <i>BamH</i> I
RK022	GCG <u>GAT CCT</u> CAG TTC CTT GGC TTG TGC	3'- <i>BamH</i> I
RK023	GCG <u>GAT CCG</u> TTC CTT GGC TTG TGC AC	3'- <i>BamH</i> I

Oligonukleotide zur Einführung des Dilysin-Motivs KKTN in den CMP-Sia-Transporter mit *BamH* I und *Xba* I Schnittstellen.

RK024	GATCC AAGAAGACTAAC TAGT
RK025	CTAGACTA GTTAGTCTTCTT G

4.1.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase (<i>Calf intestine (CIP)</i>)(10U/μl)	Amersham Pharmacia Biotech
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsendonukleasen (<i>Bam</i> H I, <i>Bst</i> X I, <i>Eco</i> R I, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I; 10-20 U/μl)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase (400U/μl)	New England Biolabs
RNase freie DNase I	Promega
RNase H	Gibco BRL
T3-RNA Polymerase (10 U/μl)	Roche
T7-RNA Polymerase (10 U/μl)	Roche
<i>Cloned Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Sigma
Dpn1 zur Dephosphorilierung von Vektoren	

4.1.10 Molekulargewichtsmarker

4.1.10.1 DNA-Marker für Agarose-Gelelektrophorese

1kb-Ladder [1 μg/μl], 7 μl pro Spur	INVITROGEN (GIBCO)
0,08; 0,13; 0,15; 0,20; 0,22; 0,30; 0,34; 0,40; 0,51; 0,52; 1,02; 1,64; 2,05; 3,05; 4,07; 5,09; 6,11; 7,13; 8,14; 9,16; 10,18; 11,20; 12,22	[kb]
100 bp-Ladder [1 μg/μl], 7 μl pro Spur	INVITROGEN (GIBCO)
100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1.000; 1.100; 1.200; 1.300; 1.400; 1.500; 2.072,	[bp]
1 kb DNA Ladder [0,5 μg/μL], 7 μl pro Spur	NEW ENGLAND BIOLABS
0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0	[kb]
λ-DNA/<i>Hind</i>III-Fragments [0,5 μg/μl], 5-10 μl pro Spur	INVITROGEN (GIBCO)
0,135; 0,56; 2,03; 2,23; 4,63; 6,68; 9,41; 23,13	[kb]

4.1.10.2 Protein-Marker für SDS-PAGE

SDS-PAGE Molekulargewichtsstandards:

<i>Low Range</i> und <i>High Range</i> 8 μl/Spur	BIORAD
14,4; 21,5; 31,0; 45,0; 66,2; 97,4	[kDa]

4.1.11 Antikörper**4.1.11.1 Primärantikörper**

mAk 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)
mAK L2-412	rat antikörper 412, monoklonaler Antikörper gegen Glucuronsäure β -1,3-Galactose
12CA5	anti-HA-mAk (Maus; Subklasse IgG _{2b}), erkennt das HA-Epitop YPYDVPDYASL (Roche)
Anti Flag M5	anti-FLAG-mAk (Maus; Subklasse IgG ₁), erkennt das FLAG-Epitop MDYKDDDDK (Sigma)
anti-Calnexin	polyklonales Antiserum aus dem Kanninchen 'Bonnie', gegen den cytoplasmatischen Teil des Calnexins gerichtet (Hammond and Helenius 1994, JCB 126, 41-52)
Anti-Mannosidase II	polyklonales Kaninchenserum, von K. Moreman (University of Georgia, Athens, GA) zur Verfügung gestellt

4.1.11.2 Sekundärantikörper

Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche
Anti-Maus-Ig Alkalische Phosphatase-Konjugat	Jackson ImmunoResearch, Dianova
HRP, anti mouse horse radish peroxidase	Jackson ImmunoResearch
Goat anti rat AP	Southern Biotechnologie Ass
Anti-Maus IgG Cy3-Konjugat	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG Alexa448-Konjugat	Molecular Probes, MoBiTec

4.1.12 „Kits“

„ <i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i> “	Roche
„ <i>NucleoSpin Plasmid Kit</i> “	Macherey & Nagel
„ <i>Plasmid Kit (Midi u. Maxi)</i> “	Qiagen
„ <i>GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> “	Amersham Pharmacia Biotech
„ <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> “	Qiagen
„ <i>QIAquick PCR Purification Kit</i> “	Qiagen
„ <i>GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge System</i> “	GibcoBRL
„ <i>Unclaspung Extract Kit</i> “	Macherey & Nagel
„ <i>Rapid DNA Ligation Kit</i> “	Roche
„ <i>QIAquick RNA Isolation Kit</i> “	Qiagen
„ <i>QuickPrep Micro mRNA Purification Kit</i> “	Amersham Pharmacia Biotech
„ <i>DIG RNA Labeling Kit</i> “	Roche
„ <i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i> “	Roche
„ <i>T7-Sequencing Kit</i> “	Amersham Pharmacia Biotech

4.1.13 Software

Acrobat Writer 5.0 und Destiller	Adobe
ChemDraw Ultra 8.0 von ChemOffice 2004	Cambridge Software
Corel DRAW 9	Corel
Corel PHOTO-PAINT 9	Corel
EditSeq 4.0	DNA-STAR
Map Draw 4.0	DNA-STAR
MS Exel 2002	Microsoft
MS Word 2002	Microsoft
Photoshop 6.0	Adobe
Reference Manager 10	ISI Research Soft
SeqMan 4.0	DNA-STAR
HMMTOP, Programm zur Strukturvoraussage	von G.E. Tusnady

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien 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.

4.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Mit einer Pipettenspitze oder einem sterilen Holzzahnstocher wurden Zellen der Kolonien auf den Agarplatten in 5 ml LB-Medium überführt. Zur Plasmidamplifizierung wurde die Kultur über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator zur folgenden Plasmidpräparation am nächsten Tag inkubiert.

4.2.3 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.

4.2.4 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 7,5% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -70°C vorgefroren. Nach mindestens 24 h wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

4.2.5 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 wieder verwendet.

4.2.6 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.

4.2.7 Transiente Transfektion mit Lipofectamin

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 1 µg 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.

4.2.8 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.

4.2.9 Immunfluoreszenz

Die Färbung wird in einer 12 oder 24 Well-Platte mit ca. 500 µl Flüssigkeit durchgeführt. 24-48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit den Zellen nach oben nur kurz in PBS getaucht, damit sich die Zellen nicht ablösen und durch Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS werden die Zellen durch Inkubation mit 500 µl 0,1%BSA, 0,1% Saponin in PBS für 30 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Tropfen des primären Antikörpers (anti-FLAG mAk M5, 5,4 µg/ml oder anti-HA mAk 12CA5, 2,5 µg/ml) und dem polyklonalem anti-Mannosidase II Serum (1:1000) oder Calnexin (1:100) in 0,1% BSA, 0,1% Tween20 in PBS für 1,5 Stunden bei RT auf dem Deckgläschen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% BSA, 0,1% Tween20 in PBS wurden die Zellen mit dem Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG (1:500) und dem Alexa 448-konjugierten anti-Kaninchen IgG (1:1000) in 0,1% BSA, 0,1% Tween20 in PBS als sekundäre Antikörper für eine Stunde bei RT unter Lichtabschluss inkubiert.

Im Anschluss an zweimaliges Waschen mit 0,1% BSA, 0,1% Tween20 in PBS, einmaligem Waschen mit PBS und abschließendem Waschen in Wasser wurden die Deckgläschen zum Entfernen des Wassers kurz abgetupft und mit einem Tropfen Moviol auf einem Objektträger fixiert. Die Objektträger werden dann Licht geschützt über Nacht bei RT getrocknet und unter dem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Lagerung erfolgt Licht geschützt bei 4°C.

4.2.10 FACS Analyse von CHO Zellen mit dem Antikörper 735

Etwa 10^6 Zellen in einer 6-Wellplatte werden 1x mit 1 ml PBS gewaschen, und dann mit PBS/ 2 mM EDTA bei 37° abgelöst, und in einem Eppendorfgefäß für 1 Min bei 4000 rpm (1500 x g) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml PBS/BSA (1%) resuspendiert. Danach wurde wieder für 1 Min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun für mit 50 µl primärem Antikörper (anti-mouse 735 oder 412) incubiert, nach 1 h bei 4°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 350 µl PBS/BSA (1%) gestoppt und das Zellpellet resuspendiert. Danach wurde erneut für 1 Min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Nun wurde das Zellpellet mit 50 µl sekundärem Antikörper (anti-mouse IgG FITC, Verdünnung 1:200) für 1 h bei RT incubiert. Die Incubation wurde erneut durch Resuspension mit 350 µl PBS/BSA und nachfolgender Zentrifugation für 1 Min bei RT mit 4000 rpm beendet. Das Zellpellet wurde ein zweites Mal mit 350 µl PBS/BSA (1%) gewaschen und erneut zentrifugiert. Als letzten Schritt wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS/BSA (1%) suspendiert und die FACS-Analyse durchgeführt. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Die Intensität der Fluoreszenz wurde im FACS-Gerät quantitativ gemessen.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 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 für 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.

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter reduzierenden Bedingungen wurden über die SDS-PAGE Proteingemische nach Größe der enthaltenen Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Verwendet wurde ein diskontinuierliches Gelsystem mit einem 3%igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 3% Polyacrylamid) und je nach aufzutrennender Proteingröße einem 7% oder 15%igen Trenngel (375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 7% bzw. 15% Polyacrylamid) aufgetrennt. Es wurden 8,5 cm und 11,5 cm breite Gele mit 6,5 cm Trennstrecke (Minigele) und für Proteine mit großem Molekulargewicht lange Gele mit 11 cm Trennstrecke verwendet (*Multilong* Gel, BIOMETRA).

Stammlösungen:

- A** 40%ige (w/v) Acrylamidlösung 4K-Mix 37,5:1 (SERVA)
- B** 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- C** 0,5 M Tris-HCl PH 6,8

X%iges Trenngel:

- 2,5·X% (v/v) Acrylamidlösung (**A**);
- 375 mM Tris-HCl pH 8,8 (**B**);
- 0,1% (w/v) SDS;
- 0,1% (w/v) APS;
- 0,1% (v/v) TEMED

3%iges Sammelgel :

- 7,5% (v/v) Acrylamidlösung 4K-Mix 37,5:1 (SERVA);
- 125 mM Tris-HCl pH 6,8 (**C**);
- 0,1% (w/v) SDS;
- 0,1% (w/v) APS;
- 0,1% (v/v) TEMED

Elektrophoresepuffer : 50 mM Tris; 385 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

Das Trenngel wurde jeweils frisch angesetzt und sofort nach Zugabe der Ammoniumperoxodisulfat-Lösung sowie TEMED in Gelträger mit Gummidichtung gegossen und mit H₂O bidest. überschichtet. Für die schmalen Minigele wurden 5 ml für die breiten Minigele 7 ml Trenngel verwendet. Die *Multilong*-Gele wurden mit 10 ml Trenngel gegossen. Nach Polymerisation wurde die Überschichtung entfernt, das Sammelgel nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und TEMED gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach Aushärten des Sammelgels und Entfernen der Gummidichtung wurde der Gelträger in die entsprechende Gelkammer eingesetzt, Elektrophoresepuffer (Tris/Glycin, s. Tabelle) in Anoden- und Kathodenkammer gegossen und der Probenkamm entfernt.

Als Acrylamid-Stammlösung wurde eine 30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% N,N'-Methylendiacylamid 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.

4.3.3 Western Blot Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit Epitop-*tag* wurden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines senkrecht zur Gelfläche orientierten elektrischen Feldes bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² Gel für 1 h im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984; Harlow und Lane, 1988). Es wurde das *semi-dry* Verfahren in einer *Fast-Blot* B44 Blotkammer (BIOMETRA) durchgeführt, bei dem zwischen zwei parallelen Platinelektrodenplatten von Anode zu Kathode folgende Bestandteile gestapelt wurden: Filterpapier 3MM (WHATMAN), Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schüll), das Gel aus der SDS-PAGE, Filterpapier 3MM (WHATMAN). Alle Bestandteile wurden vor der luftblasenfreien Stapelung in Blotpuffer (48 mM Tris; 39 mM Glycin) getränkt. Zur Überprüfung des Transfers und zur Darstellung der Molekulargewichtsmarker wurde die Nitrocellulosemembran nach Waschen in PBS für 3-5 min in Ponceau S-Lösung (0,2% w/v Ponceau S in 3% TCA) reversibel angefärbt und durch 10 minütiges Schwenken in PBS wieder vollständig entfärbt.

4.3.4 Entwicklung von Western Blots mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Proteine mit Epitop-*tag* durch eine Immunfärbung spezifisch detektiert. Die Nitrocellulosemembranen wurden für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C in 2% Magermilch in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. 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 Äquilibieren 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. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken.

4.3.5 Farbreaktion mit NBT/BCIP

Die Detektion gebundener AP-Konjugate erfolgte mit BCIP-NBT-Lösung (66 µl 25 mg/ml BCIP und 66 µl 50 mg/ml NBT in 10 ml AP-Puffer). Die Farbreaktionen wurden nach 5 bis 30 min durch Spülen mit entmineralisiertem Wasser gestoppt und die Membranen zwischen Filterpapieren getrocknet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 „Quick Checks“ von Plasmiden

100 µl Bakterienkultur wurden mit 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 10 µl Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Glycerol) versetzt, kräftig durchmischt und zentrifugiert (14000xg, 10 min, RT). 30 µl des Überstandes wurden im Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.4.9) und die Größe der Plasmid-DNA überprüft.

4.4.2 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.

4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden die QIAGEN Plasmid Kits Mini und Midi (QIAGEN) verwendet. Die darin enthaltenen Puffer setzen sich wie folgt zusammen:

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
Puffer P3:	3 M Kaliumacetat pH 5,5
Puffer QBT:	750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0,15% (v/v), TritonX-100
Puffer QC:	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol
Puffer QF:	1,25 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol

4.4.4 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 jeder Zugabe wurde vorsichtig durch Kippen der Reaktionsgefäße gemischt. 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.

4.4.5 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 das Pellet in 4 ml „Puffer P1“ resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenbecher (Nalgene) überführt. Nach Zugabe von 4 ml „Puffer P2“ wurde vorsichtig durch Kippen des Zentrifugenröhrchens gemischt und die Bakterien für 5 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml kaltem „Puffer P3“ und erneutem Mischen gestoppt. Nach 15 min Inkubation auf Eis konnten Protein-SDS-Komplexe, chromosomale DNA und hochmolekulare RNA durch Zentrifugation (20000xg, 30 min, 4°C) abgetrennt werden. Der Überstand abgenommen, gegebenenfalls erneut zentrifugiert und auf eine mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte Säule (QIAGEN-*tip* 100) aufgetragen. Danach wurde zweimal mit 10 ml „Puffer QC“ gewaschen, und die DNA mit 5 ml „Puffer QF“ eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und zentrifugiert (20000xg, 30 min, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (20000xg, 30 min, 4°C), im Vakuum der *Speedvac* getrocknet und in 100-250 µl H₂O oder TE aufgenommen.

4.4.6 Phenol/Chloroform-Extraktiom von DNA

Zur Entfernung von Proteinkontaminationen aus DNA-Lösungen wurde die Lösung mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Das Gefäß wurde gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert (14000xg, 5 min, RT). Das Phenol wurde anschließend durch einen weiteren Zentrifugationsschritt in einem weiteren *Phase Lock Gel* Zentrifugengefäß mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) aus der oberen wässrigen Phase entfernt. Anschließend wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und drei Volumen kaltem Ethanol (absolut) versetzt und die DNA für 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 14.500g, 4°C) wurde das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (14.500 g, 10 min, 4°C) und nach Trocknung in der *Speedvac* in TE-Puffer aufgenommen.

4.4.7 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.

4.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen (DNA) wurde photometrisch durch UV-Absorptionsmessung bei 260, 280 und 320 nm in einer Quarzglaszentrifugeküvette (Schichtdicke 1 cm) bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm 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.

4.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden in GEBS aufgenommen und in horizontalen Gelen je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,6% und 2,0% aufgetrennt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TBE unter Erwärmen gelöst und in horizontale Gelträger (PEQLAB) gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:2 mit 2xGEBS verdünnt und auf die erstarrten Gele aufgetragen. Als Größenstandards wurden die unter 2.1.8 angegebenen DNA-Marker verwendet. 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.

4.4.10 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“ (Amersahm 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 im Thermomixer (350 rpm, 50°C, 10 min) wurde das Gelstück vollständig aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und nach Inkubation von 1 min zentrifugiert (14000xg, 1 min, RT). Das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl „Wash Buffer“ oder äquivalentem Puffer nach 1 min Inkubation bei RT durch erneute Zentrifugation gewaschen. Die DNA wurde nach 1 min Inkubation mit 50 µl H₂O (14000xg, 1 min, RT) eluiert.

4.4.11 Restriktionsspaltung von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen in einem Volumen von 10 µl bis 100 µl in dem vom Hersteller angegebenen Puffern (NEB 1 bis 4) verdaut (37°C, 1h). Pro µg DNA wurden etwa 5 U Restriktionsenzym eingesetzt, wobei das Enzymvolumen maximal 1/10 des

Gesamtvolumens betrug. Für präparative Ansätze wurden 4-10 µg DNA und für die Analyse von Mini-Präp-DNA wurden 2-5 µl der unter 4.4.10 gewonnenen Plasmid-DNA-Lösung verwendet. Die Ansätze wurden für 30-120 min bei 37°C inkubiert.

4.4.12 Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Ligation eine Religation von linearisierten Vektoren mit köhasiven Enden zu verhindern, wurden die Enden von linearisierten Vektoren vor der Ligation dephosphoryliert. Dazu wurde etwa 1 µg linearisierter Vektor mit 1 U Alkalischer Phosphatase behandelt. Hierfür wurden in den zuvor durchgeführten Restriktionsverdau 0,5 U Alkalischer Phosphatase zugegeben und im Dephosphorylierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,1 mM EDTA) für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der linearisierte Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Gegebenenfalls wurde die Alkalische Phosphatase auch direkt nach dem Endonukleaseverdau des Vektors zugegeben.

4.4.13 Hybridisierung und Ligation von Oligonukleotiden

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 µmol Oligonukleotiden) und 5 bis 10 fmol geschnittener Vektor eingesetzt.

4.4.14 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. Die Ligationen wurden entweder für eine Stunde bei RT, über Nacht bei 16°C oder für 60 h bei 4° durchgeführt. Nach der Ligation wurden die Ansätze in *E. coli* DH5α transformiert.

4.4.15 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* DH5 α Zellen

Alle verwendeten Lösungen und Gefäße werden auf Eis vorgekühlt. 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 Glycerol 87% (v/v) wurden die Bakterien als 200 μ l-Aliquots bei -70°C eingefroren.

4.4.16 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 Temperaturschock für max. 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.

4.4.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.* 1988) wurde zur Amplifikation von DNA Fragmenten mit Oligonukleotiden durchgeführt. In der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich beliebige DNA-Sequenzen durch Einsatz einzelsträngiger und komplementärer DNA-Fragmente als Polymerisationsstartpunkte (*Primer*) unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und dNTPs vervielfältigen. Zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente wurden 30-100 ng Plasmid-DNA mit 100 pmol je Primer, 2,5 U Pfu-Polymerase (STRATAGENE) und je 200 μ M dNTPs in einem Volumen von 100 μ l in 1x PCR-Puffer (STRATAGENE) gemischt. Nach einer Denaturierung bei 94°C für 3 min wurde die Reaktion in 20-30 Zyklen durchgeführt (Zyklusparameter für die Pfu-Polymerase: 90 sec bei der *Annealing-Temperatur* T_A; 2 min/kb Template bei 72°C und für 90 sec bei 94°C). 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 dem letzten Zyklus folgten 90 sec bei der *Annealingtemperatur* und weitere 10 min bei 72°C zur Strangverlängerung (etwa 1 min pro 1000 bp zu amplifizierender DNA). Die *Annealingtemperatur* T_A wurde so gewählt, dass sie etwa 2° - 5°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten *Primer* lag. Die Schmelztemperatur T_m der *Primer* wurde anhand folgender Gleichung aus der Nukleotidzusammensetzung berechnet:

$$T_m = (\text{Gehalt an G und C}) \cdot 4^\circ\text{C} + (\text{Gehalt an A und T}) \cdot 2^\circ\text{C}.$$

Alle Reaktionen wurden in den Thermocyclern „GeneAmp PCR System 2400“ (Perkin Elmer) und im TGradient (Biometra) durchgeführt.

4.4.18 Zielgerichtete 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 4.4.17) 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 4.4.17 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.

4.4.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der MWG BIOTECH AG durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 2 µg DNA einer Mini- oder Midi-Plasmidpräparation mit ddH₂O 1:50 verdünnt. Nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 275 µl Ethanol (absolut) wurde die DNA für 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (14.500xg, 30 min, 4°C) wurde das Pellet zweimal mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (10 min, 14.500 g, 4°C) und im Vakuum getrocknet. Die gefällte DNA wurde zusammen mit je 10 µl Lösung (10 µM) der gewünschten *Sequenzierprimer* zur Sequenzierung geschickt. Isolierte genomische Phagen-DNA wurde bei der GATC Biotech AG sequenziert (Option BigRun). Dazu wurden 300 µl der DNA-Lösung in einer Konzentration von 300 ng/µl verwendet. Es wurden je Sequenzierung 30 µl Sequenzierprimer in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden im Computerprogramm *Seqman* (DNASTAR) mit vorliegenden Datenbanksequenzen verglichen.

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der subzellulären Lokalisierung

Wegen der im Golgi-Apparat stattfindenden Galactosylierung wurde eine Lokalisierung im Golgi-Apparat vorhergesagt. Der Nachweis einer UDP-Galactose Transportaktivität in Fraktionen des Golgi-Apparats bestätigte diese Lokalisierung (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 Lokalisierung im Golgi-Apparat nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Lokalisierung der UGT und CST wurden die in Tabelle 2 beschriebenen Konstrukte transient in CHO-Zellen transfiziert. Wegen ihrer mit flachen, langgestreckten Zellen anschaulichen Morphologie wurde die Zelllinien CHOP8 aus der Komplementationsgruppe Lec8 und 6B2 aus der CHO Komplementationsgruppe Lec2 (Eckhardt *et al.* 1998) verwendet. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem anti-FLAG bzw. dem anti-HA Antikörper entwickelt. Als Referenzfärbung für den Golgi-Apparat wurde ein polyklonales Serum gegen die Mannosidase II, ein im Golgiapparat lokalisiertes Enzym, verwendet. Als Referenzfärbung für das ER wurde ein gegen den cytoplasmatischen Teil des im ER lokalisierten Proteins Calnexins gerichtetes polyklonales Antiserum aus dem Känninchen 'Bonnie', verwendet. Als sekundäre Antikörper kamen Cy3- bzw. Alexa 488-konjugierte Antikörper zum Einsatz, die im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können.

5.2 Die Lokalisierung des hUGT1 und des hUGT2

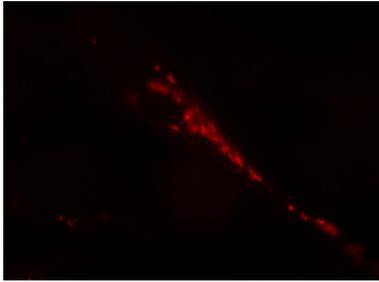
Während es vom hamUGT nur eine Form gibt, gibt es vom humanen UDP-Gal-Transporter zwei Spleißvarianten. Der hUGT2 hat die gleiche C-terminale Sequenz KVKGS wie der hamUGT. Diese Dilysin-Sequenz könnte als ER-Rückhaltesignal fungieren und dafür sorgen, dass das Protein im ER zurückgehalten wird. Der hUGT2 ist bei gleicher Aktivität wie der hamUGT ebenfalls sowohl im Golgi als auch im ER lokalisiert.

Dem etwas kürzeren hUGT1 fehlt stattdessen am C-Terminus unmittelbar vor dem Stopcodon die Dilysin-Sequenz, die als ER-Rückhaltesignal fungieren könnte. Die ersten Anzeichen, dass das Dilysin-Motiv im UGT2 als ER-Rückhaltesignal fungiert, kamen durch die Beobachtung, dass ein C-terminal markierter hamUGT ausschließlich im

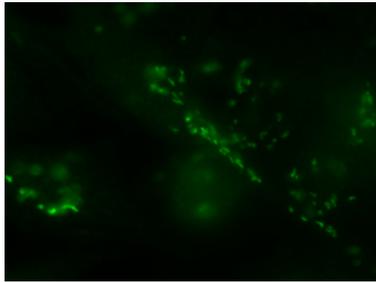
Golgiapparat lokalisiert ist, während das entsprechende N-terminal markierte Protein ein anderes Verteilungsmuster zeigt. Auch wenn die Färbung des Golgi Apparates noch sichtbar blieb, legte die zusätzliche ER-Färbung ein Zurückhalten des C-terminal markierten Proteins nahe. Diese Beobachtung erklärt auch die Ergebnisse früherer Lokalisierungsexperimente, in denen ein C-terminal getagtes Protein untersucht wurde (Ishida *et al.* 1999, Oelmann *et al.* 2001.)

Um nun direkt den Unterschied in der Lokalisierung der beiden humanen UGT1 und UGT2 Transporter zu zeigen, wurden N-terminal FLAG markierte Konstrukte bei den Spleißvarianten transient in CHO Lec8 Zellen exprimiert, und die Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt hUGT1 deutliche Kolokalisierung mit dem Golgimarker anti-Mannosidase II und keine Überlappung mit dem ER-Marker anti-Calnexin (Abb. 10). Dies bestätigt die subzelluläre Lokalisierung des Transporters im Golgi-Apparat. Im Gegensatz dazu zeigt der hUGT2 zusätzlich zum Golgisignal eine Expression auch im ER, die durch Kolokalisierung mit Calnexin nachgewiesen werden konnte. Die Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen hUGT1 und hUGT2 sind ausschließlich durch die 5 bzw. 8 Aminosäuren am C-Terminus der Transporterproteine bestimmt.

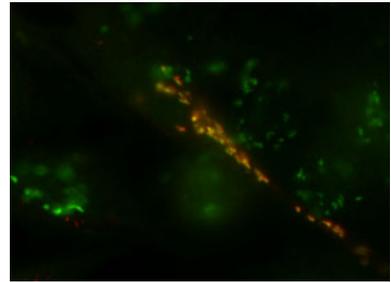
hUGT1 #1381
anti-Flag M5



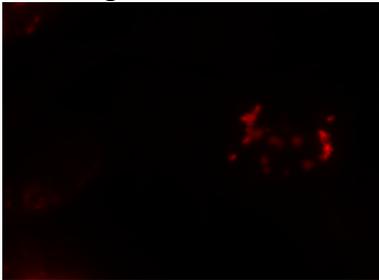
anti-Mannosidase II



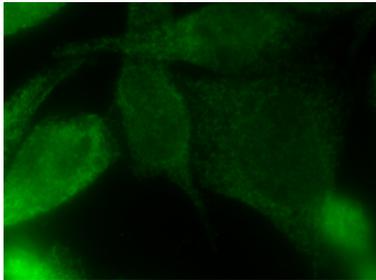
Overlay



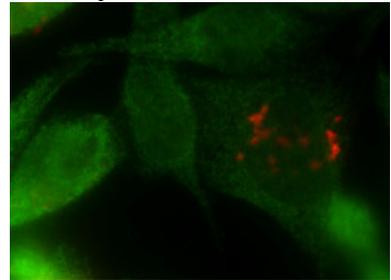
hUGT1 #1381
anti-Flag M5



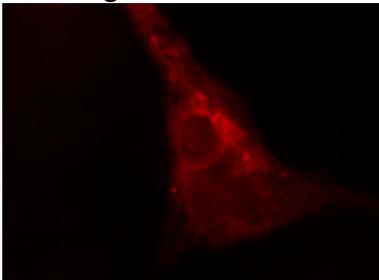
anti-Calnexin



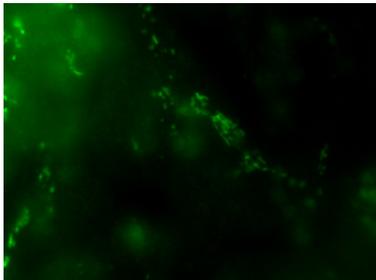
Overlay



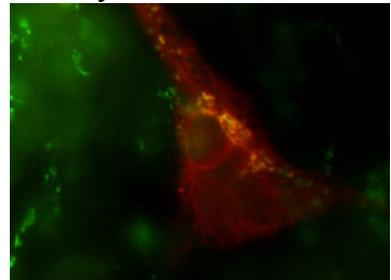
hUGT2 #1382
anti-Flag M5



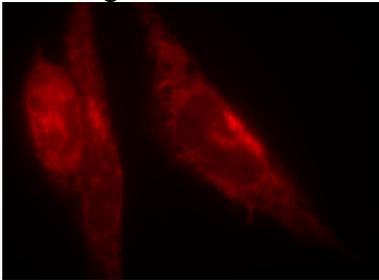
anti-Mannosidase II



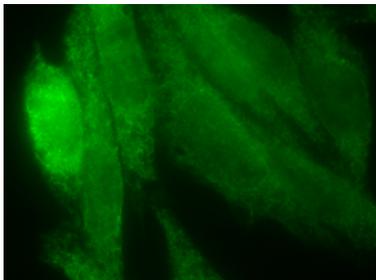
Overlay



hUGT2 #1382
anti-Flag M5



anti-Calnexin



Overlay

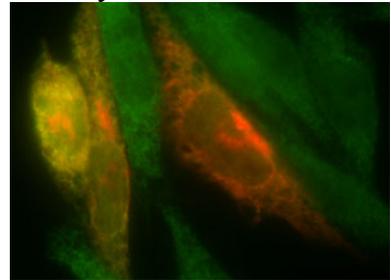


Abb.10: Die intrazelluläre Lokalisierung der humanen UGT1 und UGT2.

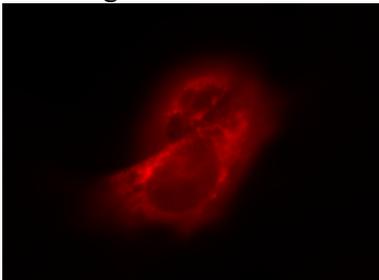
hUGT1 und hUGT2 wurden in Lec8 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) und einem ER-Marker (anti-Calnexin) verglichen. Der UGT1 ist ausschließlich im Golgi lokalisiert (obere Reihe) und zeigt keine Übereinstimmung mit dem ER-Marker. Der hUGT2 jedoch zeigt eine Expression sowohl im Golgi als auch im ER.

5.3 Die Bedeutung des Lysins an Position -3 für die Lokalisierung

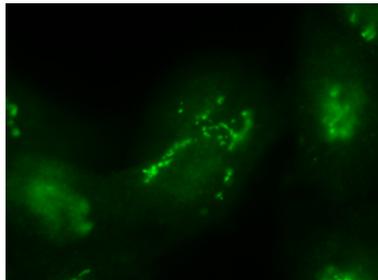
Die Sequenz des humanen und des hamster UGT war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt (Miura *et al.* 1996, Oelmann *et al.* 2001). Der klonierte hamUGT ist dem hUGT2 sehr ähnlich, hat exakt die gleiche C-terminale Sequenz und verhält sich bei der Immunfluoreszenzfärbung genau wie der hUGT2 (Abb. 10 und 11).

hamUGT #875

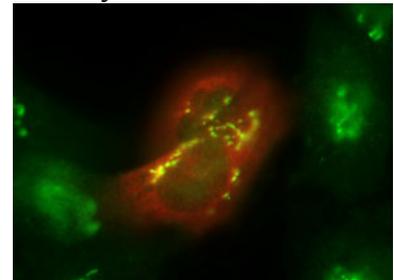
anti-Flag M5



anti-Mannosidase II

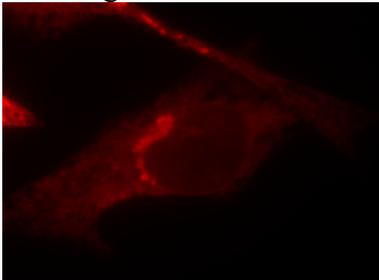


Overlay

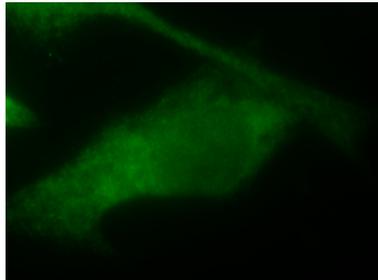


hamUGT #875

anti-Flag M5



anti-Calnexin



Overlay

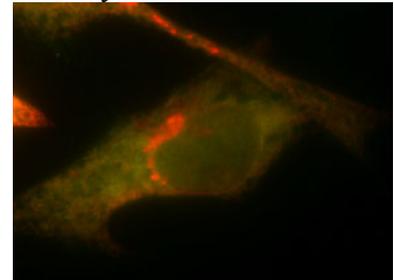


Abb. 11 Die intrazelluläre Lokalisierung des hamUGT

Der hamUGT wurde in Lec8 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) und einem ER-Marker (anti-Calnexin) verglichen. Der hamUGT ist wie schon der hUGT2 im Golgi lokalisiert und zeigt außerdem Übereinstimmung mit dem ER-Marker.

Um die Bedeutung der Dilysin-Motive des hamUGT zu bestätigen, wurde eine Punktmutation erzeugt, in der das Lysin an Position -3 durch ein Alanin ersetzt wurde (KVKGS zu KVAGS). Dazu wurde das N-terminal FLAG-markierte Konstrukt des hamUGT mit Restriktionsenzymen an *EcoR* I und *Xba* I aus dem Vektor pcDNA3 ausgeschnitten und in p-Blueskript ligiert. Durch Mutagenese-PCR (Quickchange) wurde mit Hilfe des Primers RK001 die Punktmutation K396A erzeugt, bei der das Lysin an Position -3 durch ein Alanin ersetzt wurde.

Die Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau über *EcoR* I und *Xba* I aus p-Blueskript ausgeschnitten, in pcDNA3 ligiert und durch Sequenzierung bestätigt.

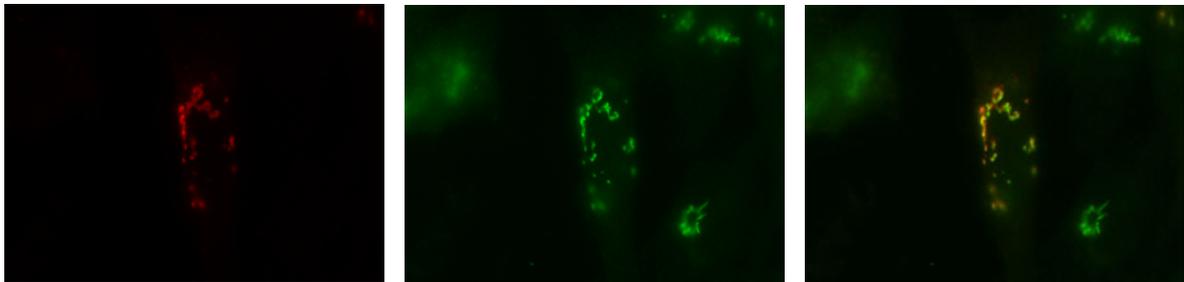
Die pcDNA3 Konstrukte wurden transient in CHO Lec8 Zellen exprimiert, und die Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt hamUGT1 mit der Mutation K396A eine deutliche Kolokalisierung mit dem Golgimarker anti-Mannosidase II und keine Überlappung mit dem ER-Marker anti-Calnexin. Eine ER Lokalisierung war nicht mehr nachzuweisen, stattdessen befand sich das Protein ausschließlich im Golgiapparat.

hamUGT mit Punktmutation KVAGS #1380

anti-Flag M5

anti-Mannosidase II

Overlay



hamUGT mit Punktmutation KVAGS #1380

anti-Flag M5

anti-Calnexin

Overlay

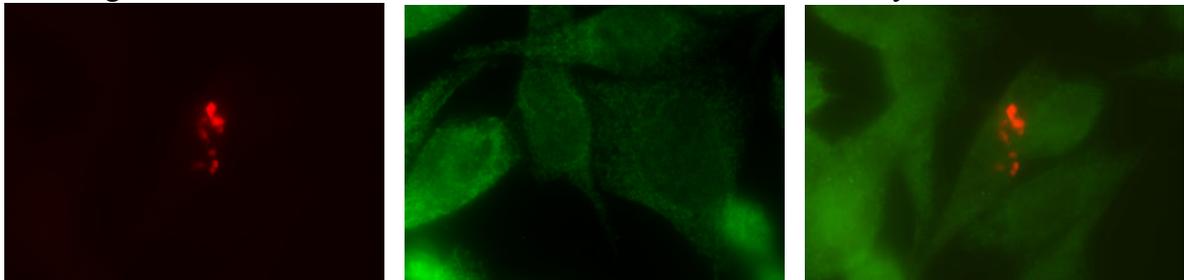


Abb.12 Das KVKGS-Motiv ist verantwortlich die Lokalisierung des Transporters im ER.

Das KVKGS Signal des hamUGT ist durch gerichtete Mutagenese zu KVAGS verändert worden. Der K395A Mutant wurden in Lec8 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) und einem ER-Marker (anti-Calnexin) verglichen. Der hamUGT mit dem zerstörten ER-Signal ist nun ausschließlich im Golgi lokalisiert, und zeigt keine Übereinstimmung mit dem ER-Marker.

Ein Ersetzen des Lysins an Position -3 bewirkt einen Transport des Proteins in den Golgiapparat. Diese Experimente zeigen deutlich, dass das Dilysin-Motiv im UGT2 als eigenständiges ER-Rückhaltesignal fungiert und bestätigt die entscheidende Rolle des Lysins in Position -3, aus früheren Untersuchungen (Zerangue *et al.* 2001).

5.4 Das KxKxx Motiv ist verantwortlich für die ER-Retention

Da der hUGT2 das mögliche ER-Rückhalte-Dilysin-Motiv KVKGS enthält, wurde untersucht, ob diese 5 Aminosäuren als eigenständiges ER-Rückhaltesignal fungieren. Deshalb wurde dieses ER-Signal einem verwandten Protein z.B. dem CMP-Sialinsäuretransporter an den C-Terminus angefügt, der ausschließlich im Golgiapparat lokalisiert ist (Eckhardt *et al.* 1999). Der CMP-Sialinsäuretransporter ist ebenfalls ein Transporterprotein (vom Typ III) mit 10 Transmembrandomänen, das aktivierte Zucker transportiert, aber ausschließlich im Golgiapparat lokalisiert ist.

Dazu wurde das N-terminal FLAG-markierte Konstrukt des hamUGT mit den Restriktionsenzymen an *EcoR* I und *Xba* I aus dem Vektor pcDNA3 ausgeschnitten und in pBlueskript ligiert. Durch Mutagenese-PCR (*Quickchange*) wurden mit Hilfe der Primer RK007 und RK008 an den Position 1173-179 zwei Punktmutationen erzeugt, die eine *Bam*HI Schnittstelle generierten. Das entstandene Konstrukt wurden durch Restriktionsverdau über *EcoR* I und *Xba* I aus pBlueskript ausgeschnitten, in pcDNA3 ligiert und durch Sequenzierung bestätigt.

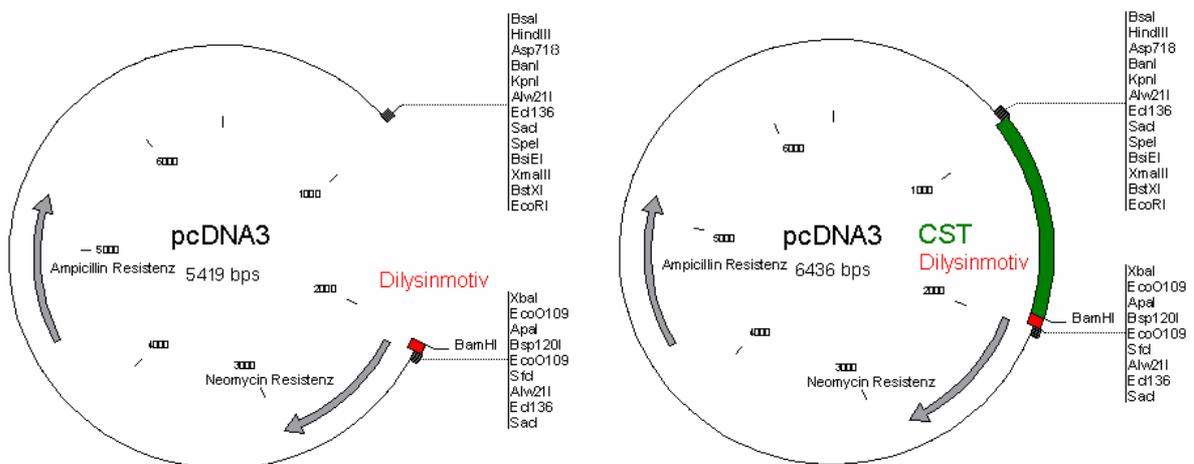


Abb. 13

Der Vector pcDNA3 mit ER-Signal

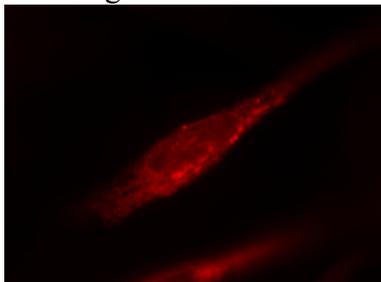
Der Vector pcDNA3 mit dem CMP-Sia-Transporter und dem ER-Signal.

Die pcDNA3-Konstrukte wurden wieder transient in CHO Lec8 Zellen exprimiert, und die Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert. Das Konstrukt unterscheidet sich vom hamUGT Transporter nur durch die Änderung der Sequenz unmittelbar vor dem Dilysin-Motiv. Die Sequenz enthält jetzt eine *Bam*HI Schnittstelle.

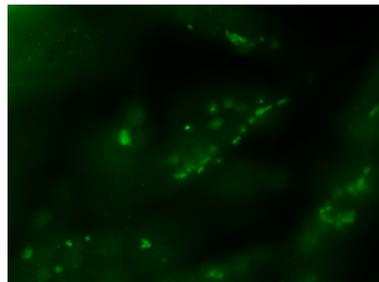
Untersuchungen an Verkürzungskonstrukten des UDP-Gal-Transporters (Oelmann *et al.* 2001) haben gezeigt, dass eine Verkürzung des Proteins am C-terminalen Ende nach der letzten Transmembrandomäne (TMD10) keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hatte. In Übereinstimmung dazu zeigen die Daten dieser Arbeit in Bezug auf die Lokalisierung und Aktivität des UGT mit einer *BamH* I Schnittstelle keinen Unterschied zur Lokalisierung und Aktivität des Wildtyps. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt der hamUGT mit der *BamH* I Schnittstelle die gleiche Lokalisierung wie der hUGT2. Wie der hUGT2 zeigt die Mutation mit der zusätzlichen Schnittstelle zusätzlich zum Golgisignal auch eine Expression im ER, die durch Kolo-kalisierung mit Calnexin nachgewiesen werden konnte.

hamUGT mit *BamH* I Schnittstelle #1262

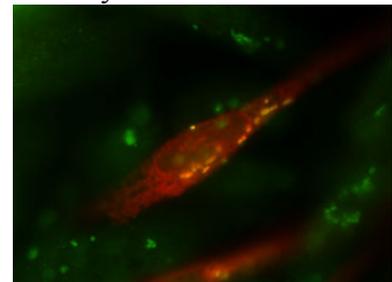
anti-Flag M5



anti-Mannosidase II

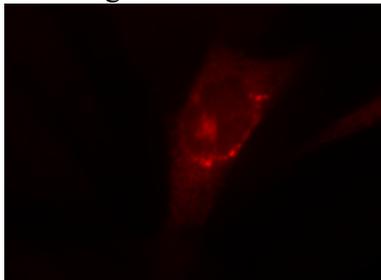


Overlay

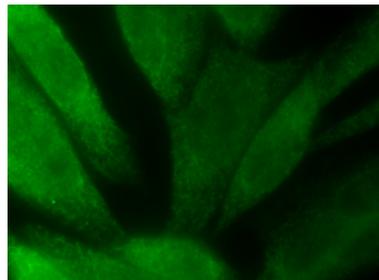


hamUGT mit *BamH* I Schnittstelle #1262

anti-Flag M5



anti-Calnexin



Overlay

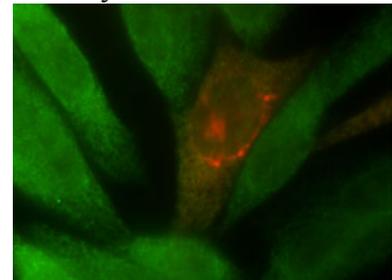


Abb. 14 Das Einfügen der *BamH* I Schnittstelle in den HamUGT hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung.

Um das ER-Signal auf einen anderen Transporter übertragen zu können, musste unmittelbar vor das KVKGS Signal durch gerichtete Mutagenese eine *BamH*I Schnittstelle generiert werden. Das Einfügen dieser Schnittstelle hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung des Transporters. Der Mutant wurden in Lec8 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) und einem ER-Marker (anti-Calnexin) verglichen. Der hamUGT mit *BamH* I ist sowohl im Golgi als auch im ER lokalisiert.

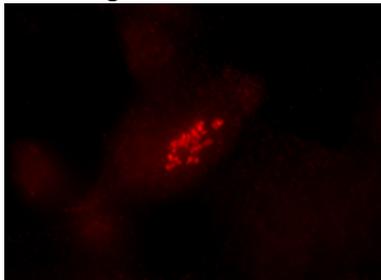
Gleichzeitig wurde der CMP-Sialinsäuretransporter für die Ligation mit dem ER-Signal vorbereitet. Mit dem Primerpaar ME71/ME42 wurden eine *EcoR* I Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine *BamH* I Schnittstelle am 3'-Ende anstelle des Stopcodons über eine PCR-Reaktion eingeführt und das Konstrukt danach über eine PCR-Präparation aufkonzentriert.

Nach dem Verdau des hamUGT mit der *BamH* I Schnittstelle und den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *BamH* I enthält der offene Vektor nur noch das Dilysin-Motiv unmittelbar hinter der *BamH* I Schnittstelle mit einem Stopcodon (Abb.13). Der analog vorbereitete CMP-Sialinsäuretransporter wird jetzt in den offenen Vektor mit dem ER-Signal des UGT über *EcoR* I und *BamH* I einligiert.

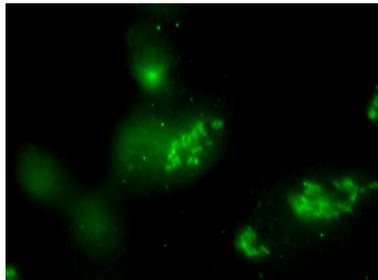
Das pcDNA3 Konstrukt wurde nach Amplifikation diesmal in CHO Lec2 Zellen transient exprimiert, und die Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert.

mCST wt #130

anti-Flag M5



anti-Mannosidase II



Overlay

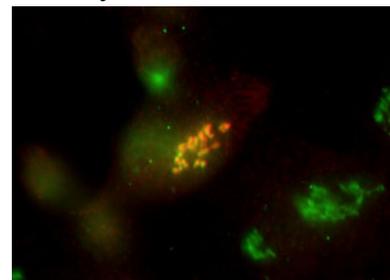
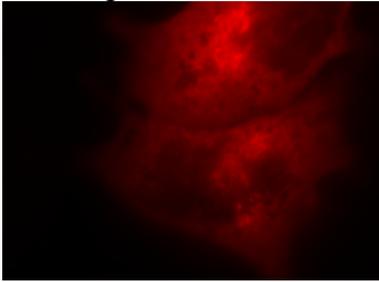


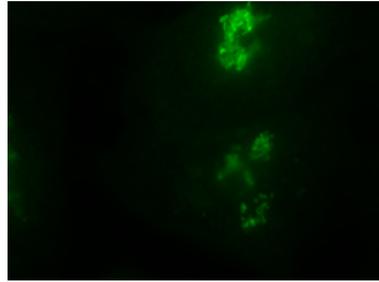
Abb. 15 Die intrazelluläre Lokalisierung des mCST (Wildtyp)

Der mCST Wildtyp wurde in Lec2 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) verglichen. Der mCST (wt) ist ausschließlich im Golgiapparat lokalisiert.

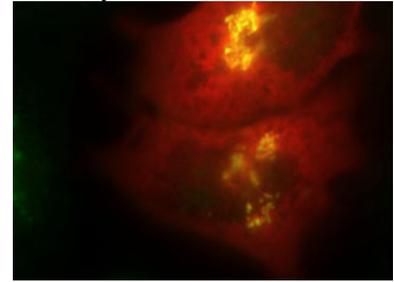
mCST + ER-Signal #1264
anti-Flag M5



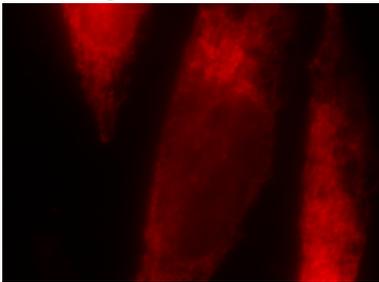
anti-Mannosidase II



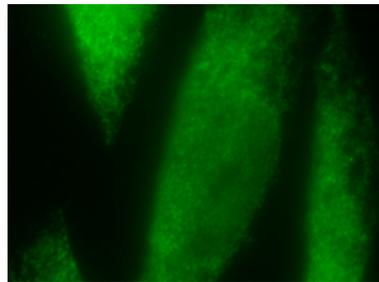
Overlay



mCST + ER-Signal #1264
anti-Flag M5



anti-Calnexin



Overlay

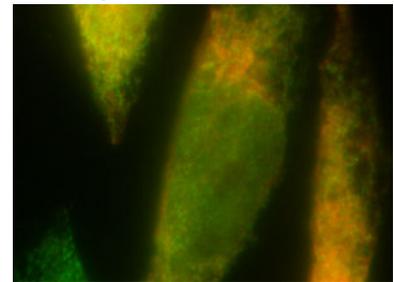


Abb.16 Das KVKGS Signal ist verantwortlich für die ER-Lokalisierung

Das ER-Signal des hamUGT wurde mit einer *Bam*H I Schnittstelle an den mCST angefügt. Als WT ist der mCST ein reines Golgi ständiges Protein. Der mCST-KVKGS ist jetzt sowohl im Golgi als auch im ER lokalisiert. Der Mutant wurde in Lec8 CHO-Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit einem Golgimarker (anti-Mannosidase II) und einem ER-Marker (anti-Calnexin) verglichen.

Wie Abb. 16 zeigt, verändert die Übertragung des Dilysin-Motivs an den kompletten CMP-Sia-Transporter die zelluläre Lokalisierung des Proteins. Im Vergleich zum Wildtyp des CMP-Sia-Transporters, der ganz klar ein im Golgi lokalisiertes Protein ist, sieht die Verteilung der mit dem KVKGS Signal versehenen Form anders aus. Jetzt ist der Transporter ganz deutlich sowohl im Golgi als auch jetzt im ER zu finden.

5.5 Generierung und Lokalisierung eines künstlichen ER-Signals des hamUGT und des mCST

In früheren Untersuchungen ist gezeigt worden, dass nicht alle C-terminalen **KKxx** und **KxKxx** Sequenzen ein Protein wirksam im ER zurückhalten können (Zerangue *et al.* 2001, Itin *et al.* 1995, Anderson *et al.* 1999). Die Tatsache, dass sowohl UGT2 als auch CMP-Sia-Transporter das Dilysin-Motiv **KVKGS** tragen und Lokalisierung sowohl im ER als auch im Golgi zeigen, wirft die Frage auf, ob dieses Verhalten den Eigenschaften der Transporterproteine zuzuordnen ist, oder ob das Dilysin-Motiv die Ursache dafür ist.

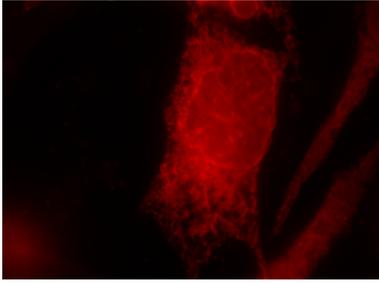
Um das herauszufinden, wurde das Dilysin-Motiv dahingehend verändert, indem das **KVKGS** im UGT2 durch ein anderes Dilysin-Motiv **KKNT** ersetzt worden ist (Zerangue *et al.* 2001). Zusätzlich wurde auch der CMP-Sia-Transporter mit diesem Signal versehen. Mit Hilfe des Primerpaars RK024/RK025 wurde ein Adapter erzeugt, der für die Aminosäuren **KKTN** sowie das Stoppsignal codiert. Am 3'Ende enthält er eine *BamH I* Schnittstelle und am 5'Ende eine *Xba I* Schnittstelle.

Das Konstrukt mit dem UDP-Gal-Transporter und der *BamH I* Schnittstelle sowie der CMP-Sia-Transporter mit dem ER-Signal wurden beide durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *BamH I* und *Xba I* vorbereitet, und mit dem Adapter aus den Primerpaaren RK024/RK025 ligiert. Dadurch wurde bei beiden Transportern das wt-Dilysin-Motiv herausgeschnitten und durch den Adapter mit dem künstlichen Signal **KKTN** ersetzt. Die pcDNA3 Konstrukte wurden wieder transient in CHO Lec8 Zellen bzw. 6B2 Lec2 Zellen exprimiert und die Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert.

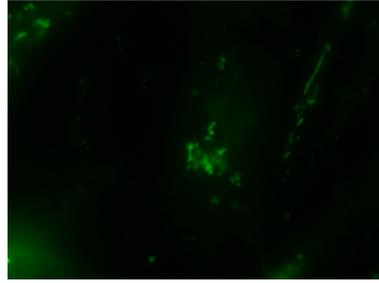
Der UDP-Gal-Transporter, der als Wildtyp sowohl im Golgi als auch im ER lokalisiert ist, ist nun ausschließlich im ER zu finden. Und selbst der CMP-Sia-Transporter, der sonst ausschließlich im Golgiapparat zu finden ist, ist nun vollständig im ER lokalisiert (Abb. 16).

All diese Experimente zeigen, dass die **KVKGS** Sequenz im UGT2 als ER-Rückhaltesignal fungiert und dass das Dilysin-Motiv Lokalisierungssignal nur als schwaches ER-Signal wirkt. Es hält das Protein nur teilweise im ER zurück. Ein Protein mit dieser Sequenz kann sowohl im ER wie auch im Golgiapparat nachgewiesen werden. Das **KKTN** Signal hingegen ist ein viel stärkeres ER-Rückhaltesignal. Es sorgt dafür, dass auch der CMP-Sia-Transporter, der sonst nur im Golgi lokalisiert ist nun nur noch im ER nachgewiesen werden kann.

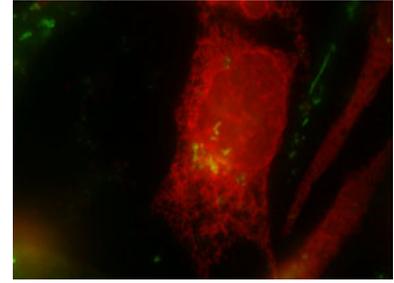
hamUGT + KKTN #1494
anti-Flag M5



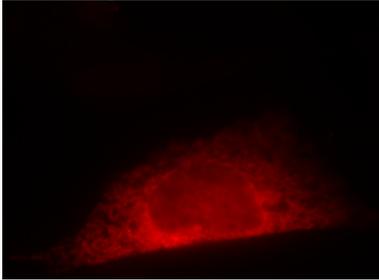
anti-Mannosidase II



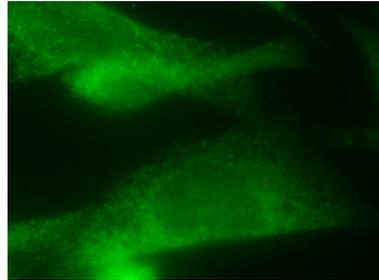
Overlay



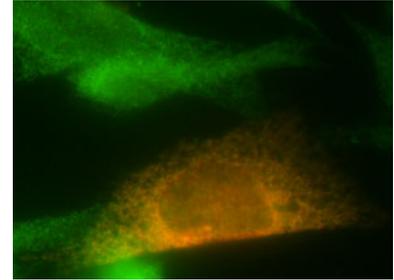
hamUGT + KKTN #1494
anti-Flag M5



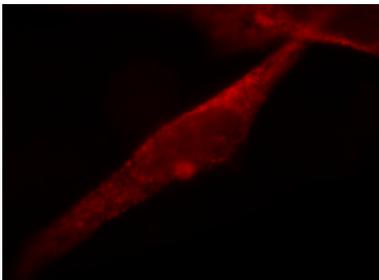
anti-Calnexin



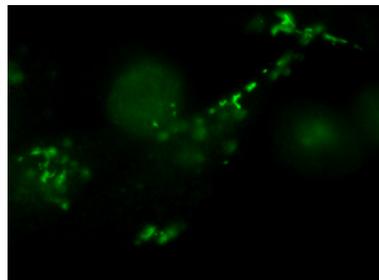
Overlay



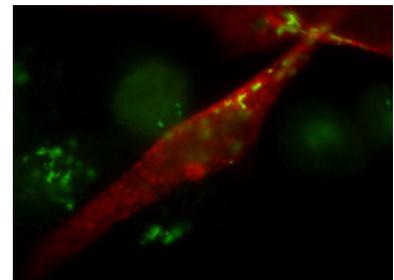
mCST + KKTN #1495
anti-Flag M5



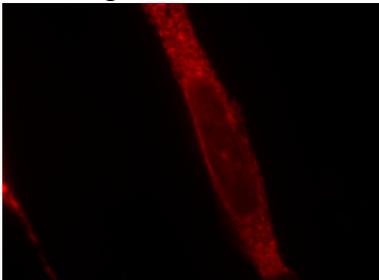
anti-Mannosidase II



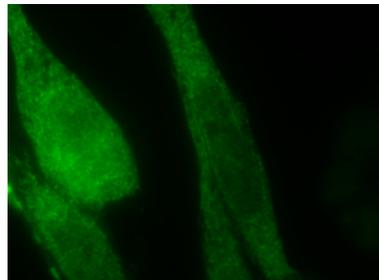
Overlay



mCST + KKTN #1495
anti-Flag M5



anti-Calnexin



Overlay

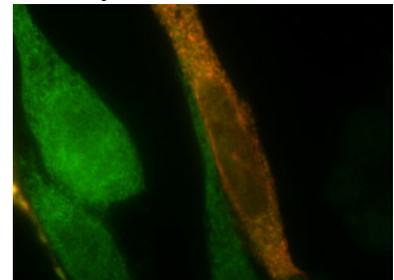


Abb. 17 Das KKTN Signal

In beiden Transporterproteinen, dem hamUGT und den mCST mit dem WT-ER-Signal des UGT wurde das KVKGS Dilysin-Motiv durch KKTN ersetzt. Beide Transporter, der hamUGT-KKTN und der mCST sind jetzt ausschließlich im ER lokalisiert.

5.6 Erzeugte Konstrukte

Tab. 2 Zur Durchführung der Untersuchungen wurden folgende Konstrukte hergestellt.

Konstrukt	Nummer	C-Terminus	Lokalisierung
hamUGT (WT)	# 875	PKLLTKVKGS	ER + Golgi
hamUGT (K396A)	#1380	PKLLTKVAGS	Golgi
hUGT1 (<i>short form</i>)	#1381	PKSVLVK	Golgi
hUGT2 (<i>long form</i>)	#1382	PKLLTKVKGS	ER + Golgi
mCST (WT)	# 130	ATSKERIIGV	Golgi
hamUGT1262 + <i>Bam</i> HI (WT)	#1262	PKLGSKVKGS	ER + Golgi
mCST + ER vom UGT (WT)	#1264	ATSKERIIGVGSKVKGS	ER + Golgi
ham UGT-KKTN*	#1494	PKLGSKKTN	ER
mCST-KKTN*	#1495	ATSKERIIGVGSKKTN	ER

Es ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass alle UDP-Galactose-Transporter und CMP-Sialinsäure-Transporter Varianten, die für diese Experimente erzeugt worden sind, unabhängig von ihrer zellulären Lokalisierung die Defekte der Lec8 bzw. Lec2 CHO Zellen komplementieren. Ihre Aktivitäten wurden durch die Änderungen der Sequenz oder die Änderung der Lokalisierungen nicht beeinträchtigt, wie die folgenden Daten zeigen.

5.7 Aktivitätstest mit der FACS-Analyse

Um zu untersuchen welchen Einfluss die Änderung der Lokalisierung der verschiedenen Konstrukte auf die Aktivität hat, wurde eine Immunfluoreszenzmessung mit Hilfe der FACS-Analyse durchgeführt. Die Konstrukte wurden dafür in Lec2 bzw. Lec8 Zellen transfiziert und nach 48 h zuerst mit dem Primärantikörper mAK412 behandelt der die Zuckerstrukturen der Polysialinsäure auf der Zelloberfläche erkennt. Als Sekundär-Antikörper wurde ein mit dem Fluoreszenzmarker FITC-gekoppelter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Auf diese Weise werden alle Zellen mit intakter PSA auf der Zelloberfläche fluoreszenzmarkiert, denn nur wenn alle Faktoren der Glykosylierungsreaktionen vorhanden sind kann PSA ausgebildet werden, und das FACS-Gerät misst eine hohe Fluoreszenz.

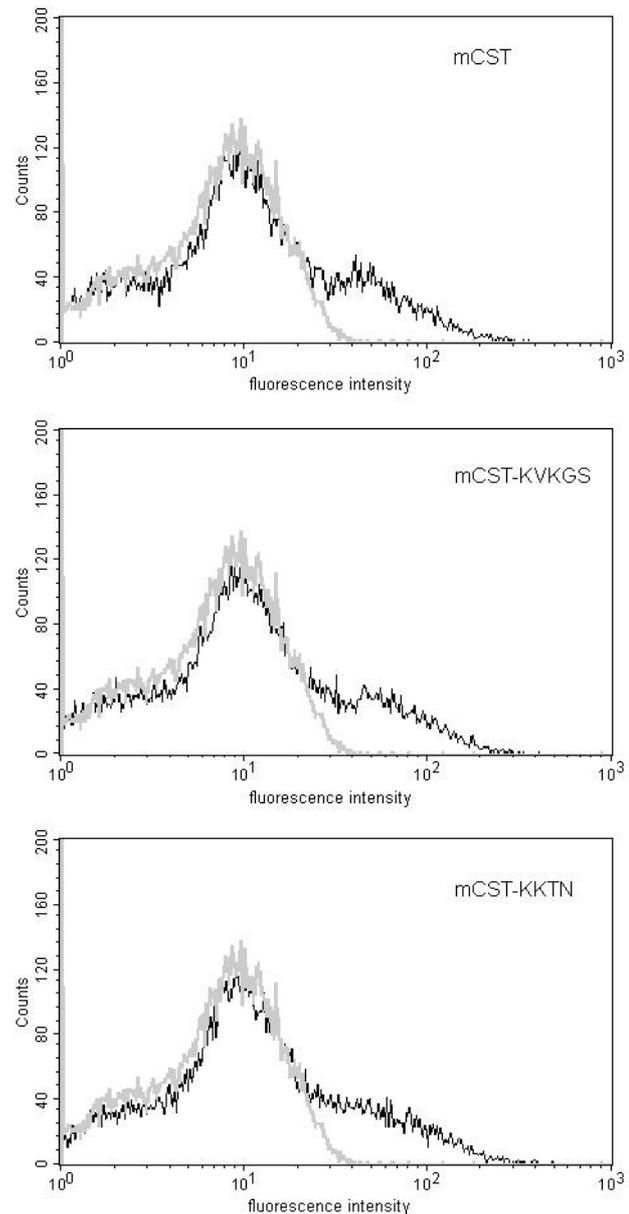
5.7.1 Aktivitätstest mit der FACS-Analyse in Lec2 Zellen

Abb. 18

FACS-Analyse der Konstrukte in Lec2 Zellen.

Die Zellen waren mit einem FITC-Antikörper markiert. Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen. Die graue Kurve stellt in allen drei Abbildungen Zellen mit transfiziertem UDP-Gal-Transporter als Negativkontrolle dar, der den Defekt des Sialinsäuretransporters nicht komplementieren kann.

Der mCST (Wildtyp), der mCST-KVKGS mit dem ER-Signal des UDP-Gal-Transporters sowie der mCST-KKTN mit dem künstlichen ER Signal wurden jeweils gegen die Negativkontrolle aufgetragen.



Als Negativkontrolle wurde der UDP-Gal-Transporter in Lec2 Zellen transfiziert. Dieser kann den Defekt der Lec2 Zellen nicht komplementieren und die Zellen bilden keine PSA auf der Zelloberfläche aus. Die drei Konstrukte des CMP-Sia-Transporters zeigen eine wesentlich höhere Fluoreszenzaktivität als die Negativkontrolle. Dabei kann man anhand der Fluoreszenzintensität der drei Konstrukte nicht zwischen dem Wildtyp und den beiden Konstrukten mit den Lokalisierungssignalen unterscheiden. Die Transporter mit dem angehängten Dilysin-Motiv aus dem Galactosetransporter und mit dem künstlichen ER-Signal zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die unterschiedliche Lokalisierung der Konstrukte hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Transporter.

5.7.2 Aktivitätstest mit der FACS-Analyse in Lec8 Zellen

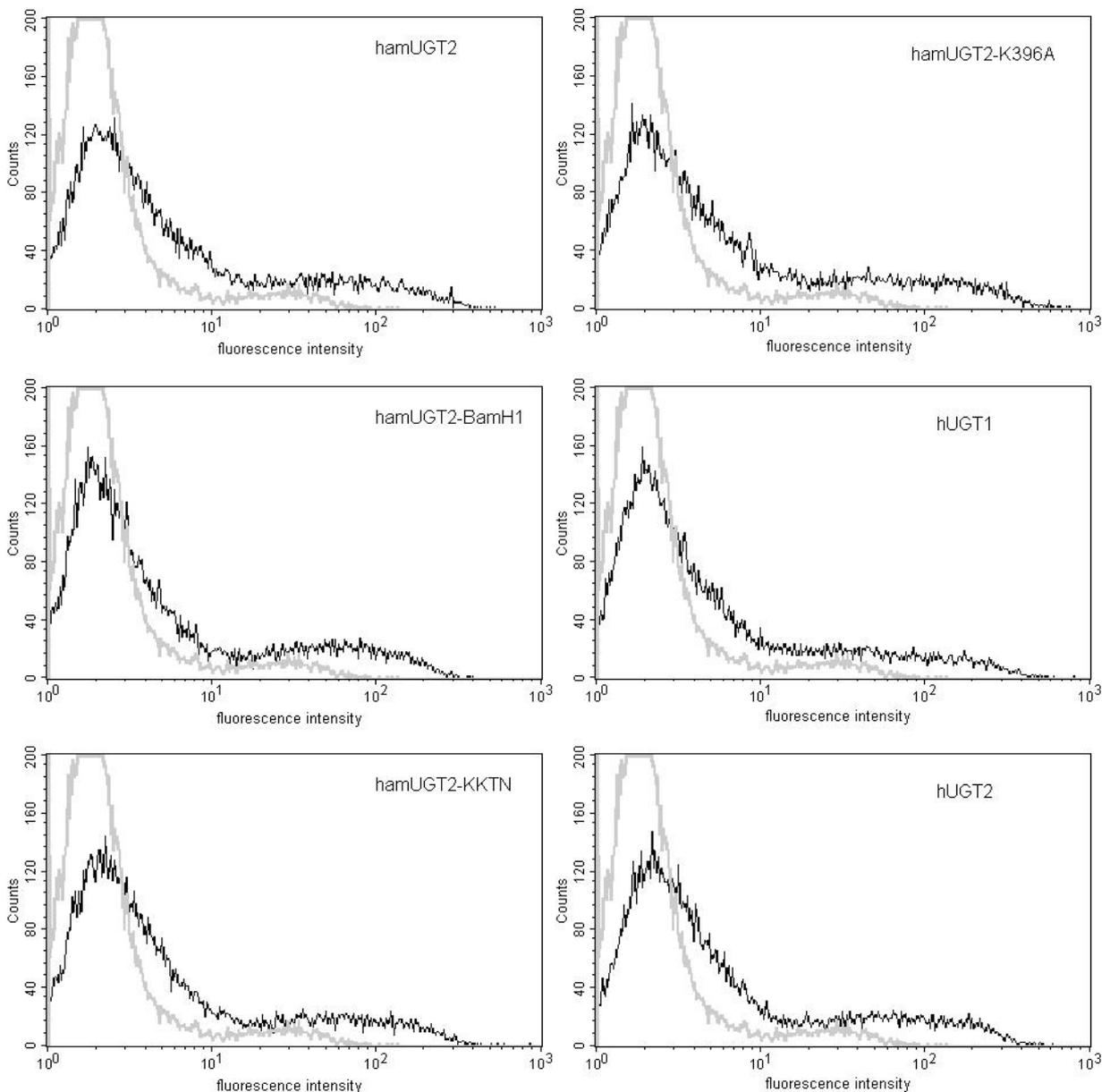


Abb. 19 FACS-Analyse der Konstrukte in Lec8 Zellen

Die Zellen waren mit einem FITC-Antikörper markiert. Die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen. Die graue Kurve stellt in allen sechs Abbildungen Zellen mit transfiziertem CMP-Sia-Transporter (Wildtyp) als Negativkontrolle dar, der den Defekt des UDP-Gal-Transporters nicht komplementieren kann. Alle Lec8 Zellen wurden mit der cDNA der entsprechenden Konstrukte und mit der Glucuronyltransferase cotransfiziert.

Es wurden der hamUGT (wt), der hamUGT-*BamH* I (mit der *BamH* I-Schnittstelle), der hamUGT-KKTN (mit dem künstlichen ER-Signal), der hamUGT-K396A (mit dem zerstörten Dilysin-Motiv) sowie die beiden humanen hUGT1 und hUGT2 jeweils gegen die Negativkontrolle aufgetragen. Alle Konstrukte zeigen eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität als die Negativkontrolle, zeigen aber untereinander keine signifikanten Intensitätsunterschiede.

Als Negativkontrolle wurde der CMP-Sia-Transporter in Lec8 Zellen transfiziert. Dieser kann den Defekt der Lec8 Zellen nicht komplementieren. Diese Zellen bilden also keine PSA auf der Zelloberfläche aus. Die 6 Konstrukte des UDP-Gal-Transporters zeigen eine wesentlich höhere Fluoreszenzaktivität als die Negativkontrolle. Dabei kann man anhand der Intensität der 6 Konstrukte nicht zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Konstrukten unterscheiden. Die Transporter hUGT1, hUGT2, der hamUGT-Transporter mit der Punktmutation, der eingefügten *BamH* I Restriktionsschnittstelle, und mit dem künstlichen ER-Signal zeigen allesamt keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität im Vergleich mit dem hamUGT, dem Wildtyp als Positivkontrolle. Die unterschiedliche Lokalisierung der Konstrukte in ER oder Golgi hat keinen Einfluss auf die Aktivitäten der Transporter.

5.8 Nachweis der Aktivität der potenziellen Transporterproteine aus *C. elegans*

Um die Mutationen, die CDG's verursachen zu identifizieren, wurden 17 Gene die für Typ III ähnliche Proteine in *C. elegans* codieren durch Computer gestützten Sequenzvergleich identifiziert. Diese 17 Gene wurden durch einen Sequenzvergleich mit den Sequenzen aus den bereits bekannten Transporterproteinen ermittelt. Der den Defekt verursachende Fucosetransporter wurde so gefunden (Lühn *et al.*, 2001). Inzwischen sind 17 Gene die für Proteine vom Typ III codieren in *C. elegans* bekannt.

Von diesen 17 wurden 12 cDNA's für diese Arbeit verwendet, um die Lokalisierungsexperimente mit den UDP-Gal- und dem CMP-Sia-Transporter durchzuführen. Um die funktionelle Aktivität der potenziellen Transporterproteine nachzuweisen, wurden die 12 *C. elegans* Transporter transient in Zellen der Komplementationsgruppe Lec8 und Lec2 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 kann die PSA-Expression wieder hergestellt werden und über den spezifischen Antikörper mAk 735 nachgewiesen werden. Lec2 Zellen haben hingegen einen Defekt beim nächsten Schritt. Sie können an die Galactose keine Sialinsäure anknüpfen, so dass auch bei Lec2 Zellen keine PSA Expression stattfinden kann. Die Fähigkeit der Transporterproteine, Lec8- bzw. Lec2-Zellen zum Wildtyp zu ergänzen, konnte über die Rekonstitution der PSA-Expression nachgewiesen werden.

Für die Analyse im Western Blot wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und das Lysat in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden Lec2-Zellen (Subklon 6B2), die einen Defekt im CMP-Sialinsäure Transporter besitzen, mit den gleichen *C. elegans* cDNA Konstrukten transfiziert wie die Lec8-Zellen. Sowohl Lec8- als auch Lec2-Zellen wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle je mit einem Galactose komplementierenden UDP-Gal-Transporter, sowie einem Sialinsäure komplementierenden CMP-Sia-Transporter (Eckhardt *et al.* 1998) transfiziert. Nach Entwicklung mit dem mAk 735 wurde sowohl bei den Lec8 Zellen wie auch bei den Lec2-Zellen nur bei Komplementierung ein charakteristisches, PSA-Signal erhalten, welches die polysialylierte Form des NCAMs darstellte.

5.9 Potenzielle Transporterproteine in *C. elegans*

Durch computergestützten Sequenzvergleich von Genen, die Typ III ähnliche Proteine codieren, wurden die Gene für 17 potenzielle Zuckertransporterproteine in *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Lühn *et al* 2001). Die pcDNA3.1 Vektoren mit diesen Genen wurden in *E. coli* DH5- α transformiert, auf LB-Agar ausplattiert, kultiviert und die Plasmide präpariert. Die Plasmide wurden in Lec2 und Lec8 CHO Zellen transfiziert und mit Methoden der Immunocytochemie mit dem Antikörper 735 untersucht. Mit dem Antikörper 735 wird Polysialinsäure u. a. auch auf Zelloberflächen nachgewiesen.

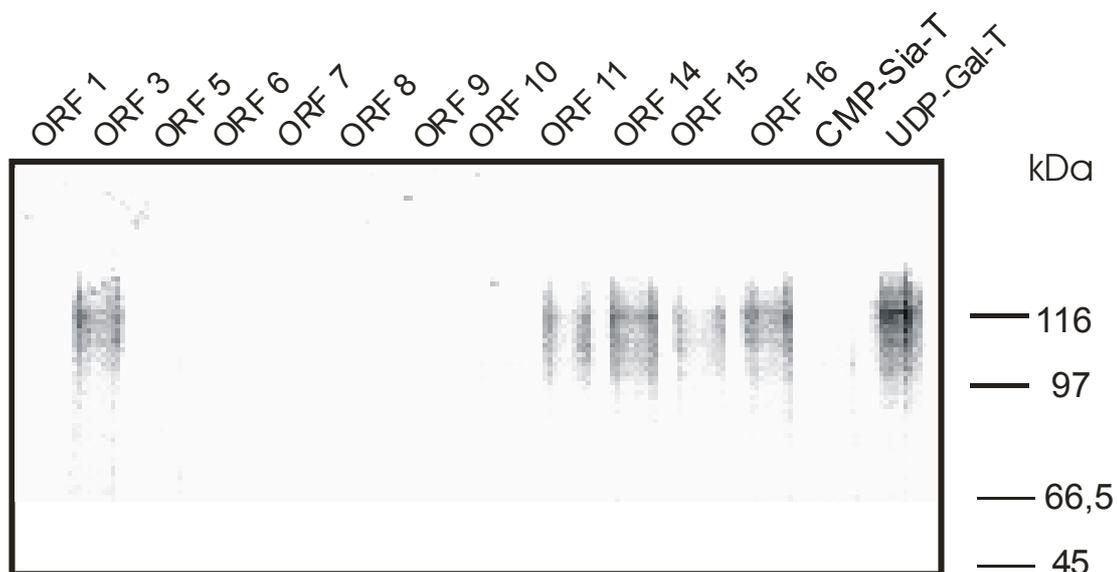


Abb. 20 Nachweis funktioneller Aktivität der potenziellen *C. elegans* Transporter durch Komplementation des Lec8-Defekts.

Darstellung der Komplementation anhand der Reexpression von PSA nach transients Transfektion verschiedener *C. elegans*-Konstrukte. Entwicklung des Westernblots mit Hilfe des anti-PSA-Antikörpers 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP.

Die UGT-Konstrukte zeigen als Positivkontrolle endogene PSA-Expression. Die Transfektion des CMP-Sia-Transporters als Negativkontrolle führte aufgrund der Substratspezifität des Transporters nicht zu einer Korrektur des Defekts in Lec8 Zellen.

Von den 12 potenziellen Transporterproteinen zeigen die Konstrukte ORF 3, ORF 14 und ORF 16 ein deutlich positives Ergebnis. Sie können den Defekt komplementieren. Die Konstrukte ORF 11 und ORF 15 zeigen zumindest eine teilweise Komplementation des Galactosetransporterdefektes. Die Aktivität der anderen potenziellen Transporter ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden.

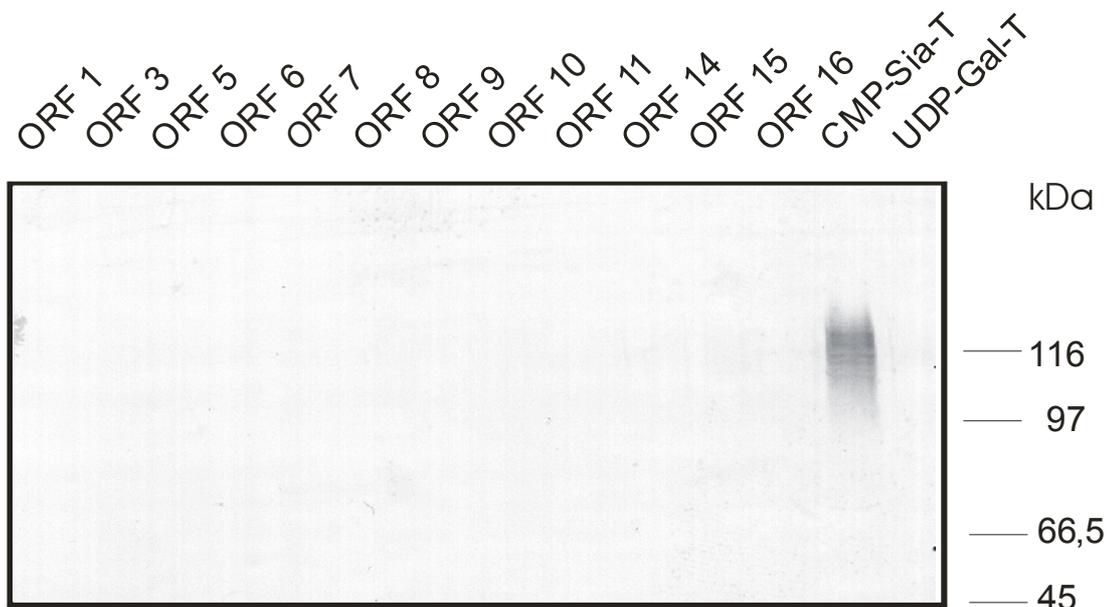


Abb. 21 Nachweis funktioneller Aktivität der potenziellen *C. elegans* Transporter durch Komplementation des Lec2-Defekts.

Darstellung der Komplementation anhand der Reexpression von PSA nach transienter Transfektion verschiedener *C. elegans* Konstrukte. Entwicklung des Westernblots mit Hilfe des anti-PSA-Antikörpers 735, AP-konjugiertem anti-Maus Ig als Sekundärantikörper und Farbentwicklung mit NBT/BCIP. CMP-Sia-Konstrukte zeigen als Positivkontrolle endogene PSA-Expression. Transfektion des UDP-Gal-Transporters als Negativkontrolle führte aufgrund der Substratspezifität des Transporters nicht zu einer Korrektur des Defekts in Lec2 Zellen. 6B2- sind CHO-Zellen der Komplementationsgruppe Lec2 mit einem Defekt im CMP-Sialinsäure Transporter (Eckhardt *et al.* 1998).

Es ist kein Transporter unter den transfizierten Konstrukten der in Lec2 Zellen der den Sialinsäuretransporterdefekt komplementieren kann. Alle Nachweise sind negativ mit Ausnahme des als Positivkontrolle eingesetzten CMP-Sia-Transporters. Dies zeigt, dass *C. elegans* im Gegensatz zu den Zellen der Säugetiere mehrere UDP-Galactose Transporter enthält, oder Transporter die außer einem anderen Substrat auch Galactose transportieren, z.B. sogenannte Multifunktionelle Transporter. Es ist unter den 12 untersuchten kein CMP-Sialinsäure Transporter vorhanden. Allerdings sind in dieser Arbeit bisher nur 12 von inzwischen 17 potenziellen Transporterproteinen untersucht worden. Die Konstrukte der ORF 2, ORF 4, ORF 12, ORF 13 und ORF 17 standen für die Untersuchungen nicht zur Verfügung.

6. Diskussion

6.1 Lokalisierung durch das Dilysin-Motiv

UGT2 enthält ein aktives Dilysin-Motiv. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Dilysin-Motiv des humanen und des Hamster UDP-Galactose-Transporters als ER-Rückhaltesignal fungiert. In den Dilysin-Motiven ist das Lysin an Position -3 essenziell, während das zweite Lysin entweder an der -4 oder -5 Position angeordnet sein kann. Allerdings führen nicht alle Sequenzen, die diese Kriterien erfüllen, zwangsläufig dazu ein Protein ins ER zu positionieren. Auch andere Aminosäuren in der Umgebung des Dilysin-Motivs spielen eine Rolle und Sequenzen mit einem Lysin an Position -4 haben viel wahrscheinlicher funktionelle Aufgaben statt als Retentionssignal zu wirken, als Proteine mit Lysinen an Position -5 (Teasdale und Jackson 1996, Zerangue *et al.* 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass beide Lysine wichtig sind für die Funktion als ER-Rückhaltesignal.

6.2 Starkes und schwaches ER-Rückhaltesignal

Wenn man diese Betrachtungen zu Grunde legt, kann man das Dilysin-Motiv des UGT2 eher als fragliches Retentionssignal betrachten. Allerdings ist in allen Experimenten ein deutlicher Unterschied in der Lokalisierung zwischen UGT1 und UGT2 festgestellt worden. Im Gegensatz zu Proteinen, die mit N-terminalen Tags exprimiert worden sind, führen Proteine mit C-terminalen Tags zu einer Färbung des Golgi. Das mögliche ER-Rückhaltesignal **KVKGS** des UGT2 wurde mutiert, um die essenzielle Position -3 zu zerstören. Dieses Experiment (in Abb. 12) führte zu einer rein Golgi lokalisierten Mutante. In einer Reihe weiterer Experimente konnte das **KVKGS** Motiv als schwaches ER-Rückhaltesignal identifiziert werden, welches seine Aktivität allerdings auch nach Übertragung auf den C-Terminus des CMP-Sialinsäuretransporters behielt.

Die **KVKGS**-Sequenz des Dilysin-Motivs sorgt auch bei Proteinen die nicht im ER, sondern ausschließlich im Golgi lokalisiert sind (CMP-Sia-Transporter oder der hUG1), für eine Umverteilung ins ER, wenn ihnen das Dilysin-Motiv angehängt wird. Allerdings ist die Rückhaltefunktion dieses Dilysin-Motivs mit der **KVKGS**-Sequenz nicht vollständig. Proteine, die dieses Signal tragen, konnten durch Immunfluoreszenz in beiden Kompartimenten nachgewiesen werden, unabhängig davon, wo sie ohne dieses Signal lokalisiert wären. Das wt-ER-Rückhaltesignal ist also ein schwaches Rückhaltesignal.

Das künstlich generierte KKTN-Signal sorgt jedoch dafür, dass Proteine wie der hUGT2, der in beiden Kompartimenten lokalisiert ist, oder der hUGT1 und der mCST, die nur im Golgi lokalisiert sind, nun ausschließlich im ER nachgewiesen werden können, ohne dass ihre Aktivität dadurch beeinflusst wird. Das KKTN Signal ist also ein viel stärkeres Rückhaltesignal als das Dilysin-Motiv KVKGS des Wildtyps. Es ist stark genug, um auch Proteine im ER zu lokalisieren, die sonst nur im Golgi und gar nicht im ER zu finden sind. Es scheint aber immer noch nicht ganz einfach zu sein, ein Dilysin-Motiv als Rückhaltesignal zu kategorisieren. Denn frühere Studien, die verschiedenen Kombinationsvarianten des Dilysin-Motivs benutzt haben, haben gezeigt, dass ein Zelloberflächenprotein, welches als Modellsubstanz mit künstlich erzeugten Dilysin-Motiven in diesen frühen Studien genutzt worden ist, in jedem möglichen Zellkompartiment zwischen ER und Zelloberfläche gefunden werden konnte (Zerangue *et al.* 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass auch ein natürlich vorkommendes Membranprotein zwei verschiedene Bestimmungsorte haben kann. Die Ergebnisse über das Vorhandensein des ER-Rückhaltesignals liefert wichtige Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieses Motivs.

6.3 Gründe für eine Lokalisierung im ER

Einer dieser Mechanismen könnte die Bildung eines Proteinkomplexes sein, wie es kürzlich im Fall des UGT1 demonstriert worden ist (Sprong *et al.* 2003). Während der UGT1 normalerweise ausschließlich im Golgi lokalisiert ist, konnte er im ER detektiert werden sobald er mit Cer-GalT, einem Mitglied der UDP-Galactosyltransferase Superfamilie, koexprimiert worden ist (Mackenzie *et al.* 1997), welches ein Dilysin-Motiv trägt (Zerangue *et al.* 2001, Nilson *et al.* 1989), und im ER lokalisiert ist (Sprong *et al.* 1998). Mit Hilfe von Co-immun Präzipitationsexperimenten fanden die Autoren physikalische Interaktionen zwischen UGT1 und Cer-GalT. Offensichtlich bleibt der Cer-Gal-Transferase wegen seines eigenen Dilysin-Motivs im ER, bindet aber an das UDP-Galctose-Transporterprotein, das daraufhin im ER verbleibt. Da die Cer-Gal-Transferase nicht in CHO Zellen exprimiert wird (Sprong *et al.* 2003), und rekombinante UGT1 vollständig in den Golgi Apparat wandern, kann ausgeschlossen werden, dass dieser zweite Mechanismus der ER Retention in CHO Zellen existiert.

Auch einige andere Mitglieder der NST-Familie enthalten Dilysin-Motive. Eins davon ist der Hefe-UDP-N-Acetylglucosamin Transporter der im ER lokalisiert werden konnte (Roy

et al. 2000). Allerdings war im Gegensatz zum hUGT2 das Anhängen eines C-terminalen Tags nicht in der Lage, das Zurückhalten im ER zu verhindern. Mehr noch, die humanen UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylgalactosamin Transporter (Muraoka *et al.* 2001) sind im ER lokalisiert worden, obwohl kein Dilysin-Signal oder ein anderes vorhanden war, was zu Erklärung beigetragen hätte. Alle diese Daten legen nahe, dass noch andere Mechanismen existieren müssen, um NST im ER zurückzuhalten. Deshalb schlage ich vor, dass ein zweiter Cer-GalT unabhängiger Mechanismus existiert, der den UDP-Gal-Transporter im ER zurück halten kann.

6.4 COP-Vesikel sorgen für den Rücktransport aus dem Golgi

Einen alternativen Mechanismus, für die Lokalisierung von Proteinen in ER und Golgi könnten COP-Vesikel erfüllen. COP-Vesikel haben eine Funktion im Transport zwischen Golgi und ER. Im Gegensatz zu COPII-Vesikeln sind COPI-Vesikel an mehreren Schritten des Proteintransportes beteiligt: an dem bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates und an dem retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER (Orci *et al.* 1986, Wieland und Harter 1999, Lowe und Kreis 1998, Harter und Reinhard 2000, Nickel und Wieland 1998).

Es wurde gezeigt, dass Coatomer-Untereinheiten *in vitro* spezifisch mit dem C-terminalen Dilysin-Motiv (K(x)Kxx) interagieren (Cosson und Letourneur 1994), einem Sortiersignal ER residenter Membranproteine, welches ihren Rücktransport ins ER sicherstellt, falls sie dieses verlassen sollten (Jackson *et al.* 1993, Nilsson *et al.* 1989). Zum anderen fand man heraus, dass Hefemutanten mit Mutationen in unterschiedlichen Genen für Coatomer-Untereinheiten Dilysin-Proteine nicht mehr effektiv zum ER zurücktransportieren können (Cosson *et al.* 1996, Letourneur *et al.* 1994).

Der retrograde Transport vom Golgi-Apparat zum ER bewirkt, dass ER-Proteine, die in COPII-Vesikeln mit verpackt werden, an ihren Wirkort zurückkehren können. Als Erkennungssequenz für den retrograden Transport kann eine KDEL-Sequenz bei Vertebraten und anderen (HDEL in der Hefe) oder ein Dilysin-Motiv (KKxx-Sequenz) dienen. Das C-terminale Dilysin-Motiv bindet direkt an die COPI-Coatomer-Komponenten und wird dabei in die COPI-Vesikel verpackt (Jackson *et al.* 1993, Letourneur *et al.* 1994, Harter *et al.* 1996).

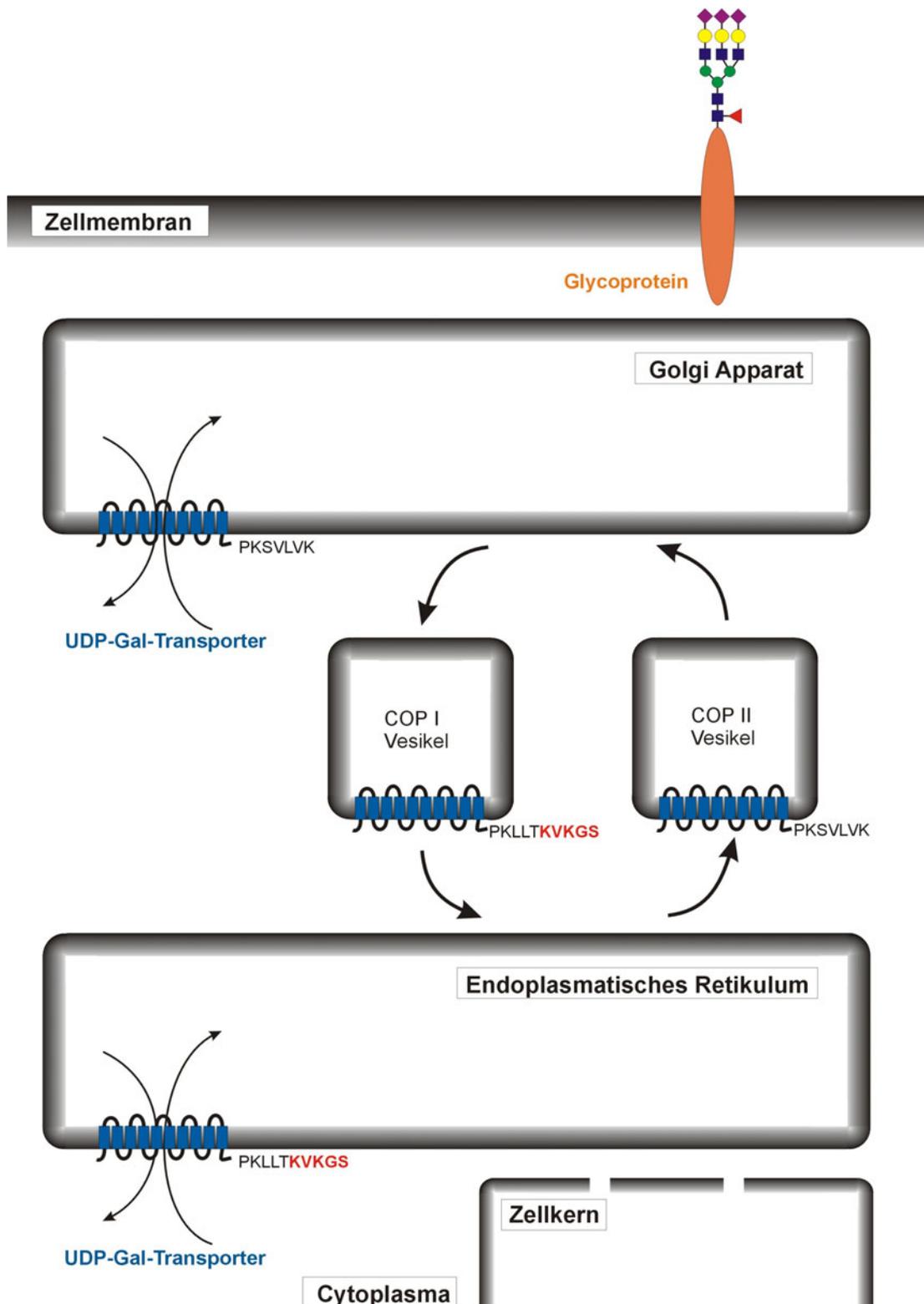


Abb. 22 Rücktransport von Proteinen mit Dilysin-Motiv mit Hilfe der COP-Vesikel
 Proteine, die an COPII-Vesikel gebunden in den Golgiapparat gelangen, können durch COPI-Vesikel wieder ins ER zurück transportiert werden, wenn sie ein Dilysin-Motiv tragen.

6.5 Aktivität der Transporter mit unterschiedliche ER-Signalen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Änderung der Lokalisierung der verschiedenen Konstrukte auf die Aktivität hat, wurde für alle Konstrukte ein Aktivitätstest mit der FACS-Analyse durchgeführt. Trotz unterschiedlicher Verteilungsmuster der Konstrukte in ER und Golgi von Lec2 bzw. Lec8 Zellen zeigten die Ergebnisse der Aktivitätstests keine signifikanten Unterschiede zum jeweiligen Wildtyp. Änderungen am C-Terminus hatten also keinen Einfluss auf die Transportaktivität der beiden Transporter.

EST Daten zeigen, dass beide Spleißformen des UGT auch in der Maus exprimiert werden. Dieses konnte später auch experimentell bestätigt werden. Northern Blots zeigen, dass beide Spleißformen in Zellen der Maus (Ishida *et al.* 1999), in CHO-Zellen (Oelmann *et al.* 2001) und jedem bisher untersuchten humanen Gewebe exprimiert werden (Ishida, unveröffentlichte Daten). Die biologische Funktion, die hinter diesen Expressionsmustern steht ist bisher allerdings unklar.

6.6 Topologie des UGT

In seiner Dissertation hat Stefan Ölmann versucht, die Topologie des UDP-Gal-Transporters aufzuklären. Er hat Tags in die Bereiche zwischen den Transmembrandomänen eingefügt um mit Hilfe von Saponin und Digitonin durch Immunfluoreszenzstudien herauszufinden, auf welcher Seite der Membran sie dann zu finden sind. Das Einfügen der Tags in die Loops zwischen die TMD funktionierte allerdings nicht immer. Nach neueren Computervoraussagen sieht die Topologie des UGT etwas anders aus als die Topologie, von der Stefan Oelmann ausgegangen ist. Deshalb waren möglicherweise einige Tags in die TMD eingebaut, waren deshalb durch Immunfluoreszenzmethoden nicht zugänglich und konnten so evtl. nicht gefunden werden. Aus dem gleichen Grund scheiterten möglicherweise eigene Versuche Tags in die Zwischentransmembrandomänen einzubauen eben daran, dass aufgrund der angenommenen Topologie nicht die geeigneten Positionen ausgewählt worden sind.

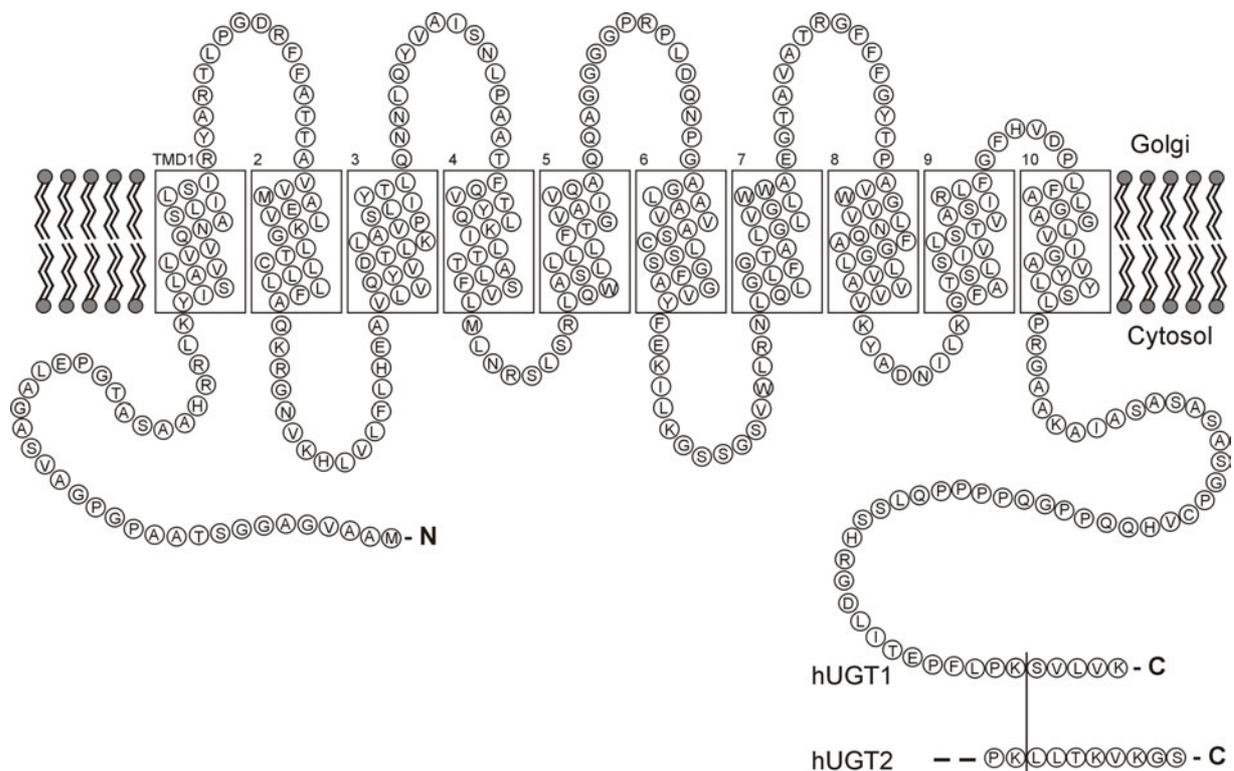


Abb 24 Topologie des UDP-Gal-Transporters UGT1 und UGT2

Diese Strukturvoraussage des hUGT1 ergibt sich aus den oben gezeigten Daten. Zu erkennen sind hier die 10 Transmembrandomänen (TMD) mit den N- und C-Termini des UDP-Gal-Transporters. UGT1 und UGT2 haben die gleiche Aminosäuresequenz und unterscheiden sich nur durch ihr C-terminales Ende.

6.7. Substratspezifität der potenziellen Transporter in *C. elegans*

Aktiviert Zucker können von alleine die Membran von ER oder Golgi nicht passieren. Und so gibt es eine ganze Reihe von Nukleotid-Zucker-Transportern. Deshalb ist man bisher davon ausgegangen, dass es für jedes Substrat einen speziellen Nukleotid-Zucker-Transporter gibt. NST sollten also substratspezifisch sein. Multifunktionelle Transporter schienen die Ausnahme zu sein. Eine dieser Ausnahme schien ein potenzieller Zucker-Nukleotid-Transporter aus *C. elegans* (SQV-7) zu sein, der in vitro sowohl UDP-Glucuronsäure, UDP-N-Acetylglucosamin und UDP-Galactose transportiert (Berninsone *et al.* 2000). In Abbildung 20 entspricht ORF 16 aus *C. elegans* dem SQV-7, was die Aktivität zum UDP-Galactose Transport bestätigt.

Weitere Ausnahmen sind der Transporter LPG2 aus *Leishmania donovani*, der neben GDP-Mannose auch GDP-Arabinose und GDP-Fucose transportiert (Hong *et al.* 2000), oder der hUGTrel7, der UDP-GlcA und UDP-GalNAc zu transportieren vermag (Muraoka *et al.* 2001). Aber je mehr Transporter kloniert und auf ihre Transportspezifität untersucht worden sind, desto mehr zeichnete sich ab, dass Transporterproteine, die mehrere Substrate binden und transportieren können, eher die Regel zu sein scheinen (Berninsone *et al.* 2001).

Die Substratspezifität der Transporterproteine wird dabei nicht so sehr durch die Struktur des ganzen Transporters an sich bestimmt, sondern mehr durch bestimmte Transmembrandomänen. Durch die Konstruktion verschiedener Chimären, die Transmembrandomänen aus verschiedenen Transportern enthielten, konnte man die Substratspezifität gezielt beeinflussen (Aoki *et al.* 1999, 2001). Für die Transportspezifität in Bezug auf das Substrat scheint dabei allerdings die Nukleotid-Base wichtiger zu sein, als der Zucker selbst.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur Transporter verschiedene Substrate akzeptieren, sondern, dass auch Substrate von mehreren Transportern transportiert werden können. Für den UDP-Galactosetransport in *C. elegans* wurde bei mindestens drei der 17 potenziellen Zuckertransporterproteine (ORF 3, ORF 11, ORF 16) eine deutliche Transportaktivität für UDP-Galactose festgestellt.

Die Aussage, dass es für jeden Zucker nur einen bestimmten Zucker-Nukleotid-Transporter gibt, lässt sich so nicht mehr aufrechterhalten. Es scheint immer mehr darauf hinzudeuten, dass die bisher gefundenen multifunktionellen Transporter eher die Regel, als die Ausnahme sind.

Damit ist aber noch nicht geklärt, ob die Transporterproteine zwar im Prinzip substratspezifisch sind, unter den Bedingungen der Überexpression dann aber doch auch andere Zucker zu transportieren vermögen; oder ob diese Transporter grundsätzlich multifunktionell sein können, dabei aber bestimmte Substrate bevorzugen.

6.8 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Funktion des Dilysin-Motivs als Lokalisierungssignal sind beide Lysine am C-Terminus unverzichtbar. Dabei wirkt das Dilysin-Motiv KVKGS nur als schwaches ER-Signal, denn Proteine mit diesem Signal werden nicht vollständig im ER zurückgehalten, sondern sind gleichzeitig auch im Golgiapparat zu finden.

Obwohl damit zumindest eine Funktion des Dilysin-Motivs, die Lokalisierung im ER zu vermitteln gezeigt worden ist, was die Punktmutationen, das Anhängen an andere nicht ER-ständige Proteine gezeigt haben, ist auch mit der Wirkung des stärkeren künstlichen Dilysin-Motivs noch nicht geklärt, ob es sich dabei um ein eigentliches ER-Rückhaltensignal handelt, oder ob es mehr ein Rückholensignal aus dem Golgi zurück ins ER darstellt. Darauf deutet zumindest die Funktion der COPI-Vesikel hin. Dieses zu untersuchen wäre ein nächster Schritt.

Mit Hilfe weiterer Studien zu Struktur-Funktions-Beziehungen könnten 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. Die Substraterkennung der Transporter scheint komplexer zu sein als bisher gedacht. Die bisherige Annahme, dass es für jedes Substrat einen eigenen Transporter gibt, scheint sich so nicht zu bestätigen. Deshalb sind weitere Untersuchungen um die Mechanismen bei der Substraterkennung und beim Transport von großem Interesse. Im Hinblick auf die Bedeutung der Zucker für die Strukturen auf der Zelloberfläche bei immunologischen oder entwicklungsbiologischen Prozessen stellen Zucker-Nukleotid Transporter in dieser Hinsicht für die Medizin sehr interessante Faktoren dar. Untersuchungen zur Substratspezifität wie die Erzeugung von Chimären aus verschiedenen Transportern könnten weitere Informationen liefern, welche Domänen der Transporter für den Transport bzw. die Erkennung des Substrates verantwortlich sind (Aoki *et al.* 2001 und 2003).

7. Literaturverzeichnis

- Abe, Hashimoto, Yoda, (1999), Molecular characterisation of Vig4/Vrg4 GDP-mannose transporter of the yeast *saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters* **458**, 309-312
- Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999), Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15080-15084
- Aoki K, Ishida N, Kawakita M, (2003), Substrate Recognition by Nucleotide Sugar Transporters: further characterization of substrate recognition regions by analyses of UDP-galactose/CMP-Sialic-acid transporter chimeras and biochemical analysis of the substrate specificity of parenteral and chimeric transporters, *J Biol Chem.* **278**, (25), 22887-22893
- Aoki, Ishida, Kawakita, (2001), Substrate Recognition by UDP-Galactose and the CMP-Sialic Acid transporters, *J Biol Chem.* **276**, (24), 21555-21561
- Aoki, Sun-Wada, Segawa, Yoshioka, Ishida, Kawakita, (1999), Expression and Activity of Chimeric Molecules between Human UDP-Galactose Transporter and CMP-Sialic Acid Transporter, *J. Biochem*, **126**, 940-950
- Ashikov A, Routier F, Fuhlrott J, Helmus Y, Wild M, Gerardy-Schahn R, Bakker H, (2005), The Human Solute Carrier Gene SLC35B4 Encodes a Bifunctional Nucleotide Sugar Transporter with Specificity for UDP-Xylose and UDP-N-Acetylglucosamine, *J Biol Chem.* **22**; 280 (29), 27230-27235
- Bakker, H., Routier, F., Oelmann, S., Jordi, W., Lommen, A., Gerardy-Schahn, R., and Bosch, D. (2005), Molecular cloning of two Arabidopsis UDP-galactose transporters by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line, *Glycobiology* **15**, 193-201
- Berninsone, Hirschberg, (2000), Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus, *Curr Opin Struct Biol.* 2000 Oct; **10** (5), 542-547
- Berninsone, Hwang, Zemtseva, Horvitz, Hirschberg, (2001), SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose, *PNAS*, **98**, (7), 3738-3743
- Burda, P. and Aebi, M. (1999), The dolichol pathway of N-linked glycosylation, *Biochim.Biophys.Acta* **1426**, 239-257
- Bossuyt, X. and Blanckaert, N. (1997), Carrier-mediated transport of uridine diphosphoglucuronic acid across the endoplasmic reticulum membrane is a prerequisite for UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver *Biochem.J.* **323** (Pt 3), 645-648
- Capasso, J. M. and 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

-
- Castro, O., Chen, L. Y., Parodi, A. J., and Abeijon, C. (1999), Uridine diphosphate-glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro evidence, *Mol.Biol.Cell* **10**, 1019-1030
- Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. and Letourneur, F. (1996), Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin- associated proteins, are involved in ER retrieval. *Embo J*, **15**, 1792-1798
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1994), Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-1631
- 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., and 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
- Deutscher, S. L. and Hirschberg, C. B. (1986), Mechanism of galactosylation in the Golgi apparatus. A Chinese hamster ovary cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose across Golgi vesicle membranes, *Journal of Biological Chemistry* **261**, 96-100
- Donald L. Jack*, Nelson M. Yang* and Milton H. Saier, Jr , (1991), The drug/metabolite transporter superfamily, *Eur J Biochem*, 2001 Jul, **268** (13), 3620-3639
- During, K. (1991), Ultrasensitive chemiluminescent and colorigenic detection of DNA, RNA, and proteins in plant molecular biology, *Anal Biochem* **196**, 433-438
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., and Gerardy-Schahn, R. (1996), Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 7572-7576
- Eckhardt M., Gerardy-Schahn R., (1997), Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter, *Eur. J. Biochem.* **248**, 187-192
- Eckhardt, Gerardy-Schahn, (1999), 2 Nucleotide Sugar Transporters, Review
- Eckhardt, Gotza, Gerardy-Schahn, (1998), Mutants of the CMP-sialic Acid Transporter Causing the Lec2 Phenotype, *J Biol Chem.* **273**, (32), 20189-20195
- Eckhardt, Gotza, Gerardy-Schahn, (1999), Membrane Topology of the Mammalian CMP-Sialic Acid Transporter, *J Biol Chem.*, **274**, (13), 8779-8787
- 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
- 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
- Gao, Dean, (2000), Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, **275**, (23), 17718-17727
- Gao, Nishikawa, Dean, (2001), Identification of a Conserved Motif in the Yeast Golgi GDP-mannose Transporter required for Binding to Nucleotide Sugar, *J Biol Chem*, **276**, (6), 4424-4432
- Gerardy-Schahn, Oelmann, Bakker, (2001), Nucleotide sugar transporters: biological and functional aspects, *Biochimie*, **83**, (8), 775-782
- Grunewald, S. und Matthijs, G. (2000), *Congenital disorders of glycosylation* (CDG): a rapidly expanding group of neurometabolic disorders, *Neuropediatrics* **31**, 57-59
- Guillen E, Abeijon C, Hirschberg CB, (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**(14), 7888-7892
- Hammond and Helenius (1994), Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus, *J Cell Biol* **126**, 41-52, (Antikörper α -Calnexin)
- Hanahan, D., (1983), Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J Mol Biol* **166**, 557-580
- 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
- Harter C, and Reinhard C (2000), The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem*. **34**, 1-38
- Harter, C. and Wieland, F.T. (1998), A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11649-11654
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001), Intracellular Functions of N-linked Glycans, *Science* **291**, 2364-2369

Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., and Abeijon, C. (1998), Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 49-69

Hirschberg, Carlos B., (2001), Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II, *J Clin Invest.*, **108**, (1), 3-6

Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J., (1998), Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells, *J. Cell Biol.* **143**, 1485-1503

Hoeflich J., Berninsone P., Goebel C., Gravato-Nobre MJ., Libby BJ., Darby C., Politz SM., Hodgekin J., Hirschberg CB., Baumeister R., (2004), Loss of srf-3 encoded nucleotide sugar transporter activity in *caenorhabditis elegans* alters surface antigenicity and preve bacterial adherence, *J. Biol. Chem*, 2004, abstract

Hong, Ma, Beverley, Turco, The Leishmania GDP-Mannose Transporter is an Autonomous, (2000), Multi-specific Hexameric Complex of LPG2 Subunits, *Biochemistry*, **39**, 2013 – 2022

Hwang HY, Horvitz HR, (2002), The SQV-1 UDP-glucuronic acid decarboxylase and the SQV-7 nucleotide-sugar transporter may act in the Golgi apparatus to affect *Caenorhabditis elegans* vulval morphogenesis and embryonic development, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **99**, (22), 14218-14223

Ioffe E, Liu Y, Stanley P., (1996), Essential role for complex N-glycans in forming an organized layer of bronchial epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (20), 11041-11046

Ishida, Miura, Yoshioka, Kawakita, (1996), Molecular Cloning and Charakterisation of a Novel Isoform of the Human UDP-Galactose Transporter, and of Related Complementary DNA`s belonging to the Nucleotide-Sugar transporter Gene Family, *J. Biochem.* **120**, 1074-1078

Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M., and Kawakita, M. (1999), Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter, *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 68-77.

Ishida, Yoshioka, Iida, Sudo, Miura, Aoki, Kawakita, (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.* **126**, 1107-1117

Ishida N, Kawakita M, (2003), Molecular physiologi and pathology of the nucleotide-sugar transporter family (SLC35), *Plügers Arch.*, PMID: 12759756

Ishida N, Kuba T, Aoki K, Miyatake S, Kawakita M, Sanai Y. (2005), Identification and characterization of human Golgi nucleotide sugar transporter SLC35D2, a novel member of the SLC35 nucleotide sugar transporter family, *Genomics*. 2005 Jan, 85 (1), 106-116

-
- Itin, C., Schindler, R., and Hauri, H. P. (1995), Targeting of protein ERGIC-53 to the ER/ERGIC/cis-Golgi recycling pathway, *Journal of Cell Biology* **131**, 57-67
- Jackson, Nilsson, Peterson, (1990), Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *The EMBO Journal* 3153-3162
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1993), Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **121**, 317-333
- JaeHoon Lee, Subha Sundaram, Nancy L. Shaper, T. Shanta Raju and Pamela Stanley (2001), Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells May Express Six β 4-Galactosyltransferases (β 4GalTs), *The Journal of Biological Chemistry*, **17**, 2001, 13924-13934
- Kainuma M., Ishida N., Yoko-O T., Yoshioka S., Takeuchi M., Kawakita M., Jigami Y. (1999), Coexpression of a 1,2 galactosyltransferase and UDP-galactose transporter efficiently galactosylates N- and O-glycans in *Saccharomyces cerevisiae* *Glycobiology*, vol. 9, 133-141
- Kamiyama S, Suda T, Ueda R, Suzuki M, Okubo R, Kikuchi N, Chiba Y, Goto S, Toyoda H, Saigo K, Watanabe M, Narimatsu H, Jigami Y, Nishihara S., (2003), Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, *J Biol Chem*. **278**(28), 25958-25963
- Kawakita, Ishida, Miura, Sun-Wada, Yoshioka, (1998), Nucleotide Sugar Transporters: Elucidation of Their Molecular Identity and Its Implication for Future Studies, *J. Biochem*. **123**, 777-785
- Kearns, A. E., Vertel, B. M., and Schwartz, N. B. (1993), Topography of glycosylation and UDP-xylose production, *J. Biol. Chem*. **268**, 11097-11104
- Kensuke Kumamoto, Yoshiko Goto, Koji Sekikawa, Seiichi Takenoshita, Nobuhiro Ishida, Masao Kawakita und Reiji Kannagi, (2001), Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants, *Cancer Research*, **61**, 4620-4627
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984), Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1 *Nature* **311**, 153-155
- Kyhse-Andersen, J. (1984), Electroblothing 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

-
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. and Cosson, P. (1994), Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **79**, 1199-1207
- Lowe M, Kreis TE (1998), Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta*. **1404**: 53-66
- Luders F, Segawa H, Stein D, Selva EM, Perrimon N, Turco SJ, Hacker U., (2003), Slalom encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in Drosophila, *EMBO J.*, **22**(14), 3635-3644
- Lübke, 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
- Lübke T., Marquardt T., Etzioni A., Hartmann E., von Figura K., Körner C. (2001), Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency, *Nature Genetics*, (1), 73-76
- Lühn, Wild, Eckhardt, Gerardy-Schahn, Vestweber, The gene defective in Leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter, (2001), *Nature Genetics*, (1), 69-72
- Ma, Russell, Beverley, Turco, (1997), Golgi GDP-mannose Uptake Requires Leishmania LPG2, *JBC* **272**, 6, 3799-3805
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., and Nebert, D. W. (1997), The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence, *Pharmacogenetics* **7**, 255-269
- Maltese WA, Wilson S, Tan Y, Suomensaaari S, Sinha S, Barbour R, McConlogue L., Retention of the Alzheimer's amyloid precursor fragment C99 in the endoplasmic reticulum prevents formation of amyloid beta-peptide, *J Biol Chem*. 2001, **276** (23), 20267-20279
- Martinez-Duncker I, Mollicone R, Codongo P, Oriol R, (2003), The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach, *Biochimie*, **85**, (3-4), 245-260
- Meech, R. and Mackenzie, P. I. (1997), Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases, *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **24**, 907-915
- Miura, Ishida, Hoshino, Yamauchi, Hara, Ayusawa, Kawakita, (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.* **120**, 236-241

-
- Münster A.-K., Weinhold B., Gotza B., Mühlenhoff M., Frosch M., Gerardy-Schahn R. (2002), Nuclear Localization Signal of Murine CMP-Neu5Ac Synthetase Includes Residues Required for Both Nuclear Targeting and Enzymatic Activity*, *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, (22), 10688-19696
- Muraoka, Kawakita, Ishida, (2001), Molecular characterisation of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity, *FEBS Letters* **495**, 87-93
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. A. (1989), Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *Cell* **58**, 707-718.
- Nickel W, Wieland FT (1998), Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol.* **109**: 477-486
- Oelmann, Stanley, Gerardy-Schahn, (2001), Point Mutations identified in Lec8 CHO Glycosylation Mutants that Inactivate Both the UDP-Galactose and CMP-Sialic Acid Transporter, *JBC* 276 (28) 26291-26300
- Orci, L., Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1986), A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack, *Cell*, **46**, 171-184
- Perez, M. and 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
- 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
- Roy, S. K., Chiba, Y., Takeuchi, M., and 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
- Segawa H., Kawakita M., Ishida N., (2002), Human and Drosophila UDP-galactose transporters transport UDP-N-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose, *Eur. J. Biochem.* **269**, 128-138
- Sommers, L. W. and Hirschberg, C. B. (1982), Transport of sugar nucleotides into rat liver Golgi. A new Golgi marker activity, *J.Biol.Chem.* **257**, 10811-10817

Sprong, Degroote, Nilson, Kawakita, Ishida, van der Sluijs, van Meer, (2003), Association of the Golgi UDP-Galactose transporter with UDP-Galactose: Ceramide Galactosyltransferase Allows UDP-Galactose Import in the Endoplasmic Reticulum, *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3482-3493

Sprong, Kruithof, Leijendekker, Slot, van Meer, van der Sluijs, (1998), UDP-Galactose: Ceramide Galactosyltransferase Is a Class I Integral Membrane Protein of the Endoplasmic Reticulum, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 40, 25880-25888

Stanley, P. (1983), Lectin-resistant CHO cells: selection of new mutant phenotypes. *Somatic Cell Genet* **9**, 593-608.

Suda T, Kamiyama S, Suzuki M, Kikuchi N, Nakayama K, Narimatsu H, Jigami Y, Aoki T, Nishihara S., (2004), Molecular cloning and characterization of a human multisubstrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to Drosophila fringe connection, *J Biol Chem*, **279** (25), 26469-26474

Tanaka N., Takegawa K. (2001), Funktional characterisation of Gms1p/UDP-galactose transporter in *Schizosaccharomyces pombe*, abstract

N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda (Eds.) (2002), Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, *Springer-Verlag*, Tokyo

Teasdale, Jackson, (1996), Signal-Mediated Sorting of Membrane Proteins between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Aparatus, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12** 27-54

Terayama, K., Oka, S., Seiki, T., Miki, Y., Nakamura, A., Kozutsumi, Y., Takio, K., and Kawasaki, T. (1997). Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6093-6098

Tiralongo, Abo, Danylec, Gerardy-Schahn, von Itzstein, (2000), A High-Throughput Assay for Rat Liver Golgi and Saccharomyces cerevisiae-Expressed Murine CMP-N-Acetylneuraminic AcidTransporter Proteins Analytical Biochemistry **285**, 21-32

Toma L., Pinhal M. A. S., Dietrich C. P., Nader H. B., Hirschberg C B, (1996), Transport of UDP-Galactose into the Golgi Lumen Regulates the Biosynthesis of Proteoglycans, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 3897-3901

Tusnady, G. E. and Simon, I. (2001), The HMMTOP transmembrane topology prediction server, *Bioinformatics* **17**, 849-850

Wieland F, Harter C (1999), Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 440-446

de Wildt, S. N., Kearns, G. L., Leeder, J. S., and van den Anker, J. N. (1999), Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects, *Clin. Pharmacokine*, **36**, 439-452

Michaela Windfuhr, Arnd Manegold, Martina Mühlenhoff, Matthias Eckhardt u. Rita Gerardy-Schahn, (2000), Molecular Defects That Cause Loss of Polysialic Acid in the Complementation Group 2A10, *Biol. Chem.*, Vol. **275**, Issue 42, 32861-32870

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., and 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

Zerangue N., Malan M.J., Fried S. R., Dazin P. F., Jan Y. N., Jan L. Y., Schwappach B. (2001), Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells, *PNAS* **98** (5) 2431-2436

Zuber, C., Fan, J. Y., Guhl, B., Parodi, A., Fessler, J. H., Parker, C., and Roth, J. (2001), Immunolocalization of UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control, *roc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 10710-10715

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

8.2 Danksagungen

8.3 Lebenslauf

8.4 Publikationen

8.5 Erklärung

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
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
CDG's	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i> , (angeborene Fehlbildung bei Glykosylierungsreaktionen)
cDNA	Komplementäre DNA
Cer-GalT	Ceramidgalactosyltransferase
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarien</i> Zelllinie
CHOP8	CHOLec8 Zelllinie mit Expression des LT-Antigens des Polyomavirus
CMP	Cytidinmonophosphat
COP	Coat Protein
CsCl	Cäsiumchlorid
CSPD	di-Natrium-3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo-[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
CST	CMP-Sialinsäure Transporter
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton, Molekulargewicht, 1 Da = 1,0000 g/mol ~ Masse des Wasserstoffatoms: = 1,6605402*10 ⁻²⁷ kg
ddH ₂ O	<i>di-distilled</i> (destilliertes entmineralisiertes) Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo NE	Endoneuraminidase NE
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	F luorescence a ctivated c ell s orting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fötale Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
g	Mittlere Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCN	Guanidiniumisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GEBS	Glycerol, EDTA, Bromphenolblau, Sarcosyl - Lösung
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronic Acid, Glucuronsäure
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
GMT	GDP-Mannose Transporter
GTP (G)	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) oder human
HA	Hämagglutinin
ham	Hamster
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacZ	β -Galactosidasegen
LB	Luria Bertani (Medium)
Lec	Lec Mutanten = Mutanten mit veränderter Bindung an Lectine
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MOPS	3-[<i>N</i> -Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-(Boten-)RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NANA	<i>N</i> -Acetyl-Neuraminic-Acid = Sialinsäure
NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
NCAM	neural cell adhesion molecule (Neuronales Zelladhäsionsmolekül)
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure = NANA = Sialinsäure
NST	Nucleotide sugar transporter, Nukleotid-Zucker-Transporter
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte

ORF	open reading frame, offenes Leseraster
P _i	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAPS	3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat,
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSA	Polysialinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Sia	Sialinsäure
SLC	S olute c arrier family
TAE	Tris-Acetat-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
UDP-GalNAc	UDP- <i>N</i> -Acetylgalactose
UDP-Glc	UDP-Glucose
UDP-GlcA	UDP-Glucuronsäure
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -Acetylglucose
UDP-Xyl	UDP-Xylose
UGlcNAcT	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin Transporter
UGT	UDP-Galactose Transporter
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
Vgl.	Vergleich
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid
Xyl	Xylose

8.2 Danksagungen

Ich bin Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn sehr dankbar dafür, dass sie mir die Promotion möglich gemacht hat. Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich für die sehr gute Betreuung sowie die Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Prof. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Korreferates und seine lebenswürdige und zuvorkommende Hilfsbereitschaft.

Einen Herzlichen Dank möchte ich auch an Dr. Stefan Oelmann richten, für die Einführung in die Thematik in Theorie und Praxis, sowie an Birgit Tiemann und Melanie Grove, die mir im Labor oft hilfreich zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Hans Bakker für die gute Betreuung im Labor, viele praktische Tipps, die intensive Unterstützung und viele anregende Diskussionen, die mir viel geholfen haben. Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Hans Bakker und David Schwarzer für das Korrekturlesen dieser Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Dagmar Grambow-Rogge, die mir manches an Organisation und Lehrtätigkeit abgenommen hat, wenn es zeitlich mal wieder eng wurde, sowie bei Christa Zeigner für die Organisation im Hintergrund.

Bei Monika Berger, Andrea Bethe, Klaus-Peter Beyer, Bodo Dierks, Evelin Herzog, Jacqueline Ludewig, Astrid Oberbeck und Ulrike Peters bedanke ich mich für die professionelle technische, organisatorische und aktive Unterstützung im Labor.

Dr. Anne Lamerz, Dr. Martina Mühlhoff, Dr. Anja Münster-Kühnel, Dr. Katharina Stummeyer und Dr. Birgit Weinhold danke ich für ihre gute Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich weiterhin bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für das angenehme Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft, die gemeinsamen Mensagänge und die vielen, vielen leckeren Kuchen bedanken, die mir so manchen Nachmittag versüßt haben, als da wären Jutta Fuhlrott, Bernd Gebhardt, Almut Günzel, Imke Oltmann, Melanie Oshlies, Philipp Schmalhorst, David Schwarzer, Anita Stolze und Bernd Weitzel.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Dr. Neumann aus der Pharmakologie bedanken, der mir bei der Durchführung der FACS-Analysen behilflich war.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Roland Kabuß
Geburtsdatum, -ort: 12.01.1963 in Böblingen
Adresse: Schützenstraße 1, 30161 Hannover
E-mail: Kabuss.Roland@mh-hannover.de
Eltern u. Geschwister: Jutta und Hans-Dieter Kabuß sowie Beate, Marcus und Stefan
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schule/Wehrdienst

1969 - 1973 Grundschule in Lügde
1973 - 1983 Gymnasium in Bad Pyrmont, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1983 - 1984 Grundwehrdienst in Augustdorf

Hochschulstudium

1984 - 1993 Studium der Chemie an der Universität Hannover
26.10.1987 Diplomvorprüfung
1992 - 1993 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biotechnologie am Institut für Technische Chemie
Titel der Diplomarbeit: „Entwicklung geeigneter Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Enzymkartuschen“
01.03.1993 Diplom im Fach Chemie

Lehrtätigkeit in den Fächern Chemie und Biochemie

1993 - 1997 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Medizinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
1998 - 2000 Wissenschaftlicher Angestellter im Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Promotion

2001 – 2005 Promotion bei Frau Prof. Rita Gerardy-Schahn in der Abteilung Zelluläre Chemie an der Medizinischen Hochschule Hannover

8.4 Publikationen

8.4.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

H. Jürgens ^a, **R. Kabuß** ^a, T. Plumbaum, ^a B. Weigel ^a, G. Kretzmer ^a, K. Schügerl ^{a*}, K. Andres ^b, E. Ignatzek ^b, F. Giffhorn ^c, ^a Institute for Technical Chemistry, University of Hannover, Callinstr. 3, D-30167 Hannover, Germany, ^b Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany, ^c Institute of Applied Microbiologie, University of Saarland, Saarbrücken, Germany, *Development of enzyme-cartridge flow-injektion analysis for industrial process monitoring. Part I Development and characterisation. Analytica Chimica Acta* 298 (1994) 141-149.

Kabuß R., Ashikov A., Oelmann S., Gerardy-Schahn R.* and Bakker H., *ER retention of the large splice variant of the UDP-galactose transporter is caused by a di-lysine motif*, Glycobiology 2005, Abteilung Zelluläre Chemie, Zentrum Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

8.4.2 Kongressbeiträge (Abstracts/Poster)

19.09.2002 – 22.09.2002

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeitrag im Rahmen des *Third International Symposium on Glycosyltransferases* vom 19. bis 22. September 2002 in Stockholm, Schweden präsentiert. Ashikov A., **Kabuß R.**, Oelmann S., Gerardy-Schahn R., Routier F., Bakker H., *The long form of the UDP-Galactose transporter (UGT-2) is retained in the ER.*

20.09.2003 – 24.09.2003

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit als Posterbeitrag im Rahmen der *Third meeting of the European Life Scientist Organization (ELSO)* zusammen mit der *German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM)*, vom 20. bis zum 24. September 2003 in Dresden, Deutschland präsentiert. **Kabuß R.**, Ashikov A., Oelmann S., Routier F., Gerardy-Schahn R., Bakker H., *A di-lysine motif in the long form (UGT-2) of the Mammalian UDP-Galactose transporters mediates ER retention.*

20.09.2003 – 24.09.2003

ELSO abstract Dresden 2003, *A di-lysine motif orchestrates the distribution of the mammalian UDP-Galactose transporter 2 between Golgi and ER*, **Kabuß, R.**, Ashikov, A., Oelmann, S., Routier, F., Gerardy-Schahn, R., Bakker, H.

8.4.3 Kongressbeiträge (Vorträge)

25.03.2004 – 26.03.2004

Contenterstellung mittels ILIAS im Fach Zelluläre Chemie und Allgemeinmedizin, Döbler K., **Kabuß R.**, Gerardy-Schahn R., Matthies H. K., Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Medizinische Informatik, Abteilung Zelluläre Chemie, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover. Proceedings zum 8. Workshop der GMDS AG *Computergestützte Lehr- und Lernsysteme in der Medizin*, Universität zu Lübeck, 25. - 26. März 2004.

08.10.2004 – 10.10.2004

11. Tagung der Gesellschaft für medizinische Ausbildung (GMA) vom 08.10.2004 bis zum 10.10.2004 in der Charité in Berlin, *Integration medizinischer Bezüge in das Seminar und Praktikum Chemie*, **Kabuß R.**, Grambow-Rogge D. und Gerardy-Schahn R., Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Zelluläre Chemie, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

08.10.2004 – 10.10.2004

11. Tagung der Gesellschaft für medizinische Ausbildung (GMA) vom 08.10.2004 bis zum 10.10.2004 in der Charité in Berlin, Döbler K., **Kabuß R.**, Gerardy-Schahn R., Matthies H. K., *E-Learning als Unterstützung des Kurspraktikums Chemie*, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Medizinische Informatik, Abteilung Zelluläre Chemie, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

8.5 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 zugrunde liegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, 20.05.2005

Roland Kabuß