

**Rekombinante Expression von humanen
Xylosyltransferasen in der methylotrophen Hefe
Pichia pastoris und in dem Bakterium *Escherichia coli***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Javier Carrera Casanova
aus Frankfurt am Main
Dezember 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2008 unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Knut Kleesiek im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin am Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dr. Hartmut Niemann, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn PD Dr. rer. nat. Christian Götting und Dr. rer. nat. Joachim Kuhn möchte ich für die gute Betreuung, die vielen wertvollen Ratschläge sowie Anregungen und für die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Meinen Kollegen Alexandra Adam, Michael Ambrosius, Marlen Ewald, Doris Hendig, Christoph Lichtenberg, Benjamin Müller, Claudia Pönighaus, Christian Prante, Christina Roch, Melanie Störmer, Tanja Vollmer und Ralf Zarbock danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Besonders danken möchte ich ebenfalls meinen Eltern für die große Unterstützung, die sie mir zukommen ließen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Proteoglykane	3
2.2	Glykosaminoglykane	4
2.3	Glykosyltransferasen.....	7
2.4	Xylosyltransferasen	9
2.5	Glykosaminoglykan/Protein-Interaktionen.....	11
2.6	Ziel dieser Arbeit.....	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Bakterien-Stämme und Wachstumsbedingungen.....	15
3.1.2	Hefe-Stämme und Wachstumsbedingungen.....	15
3.1.3	Plasmide.....	16
3.1.4	Oligonukleotide.....	16
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	19
3.2.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	19
3.2.2	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> -Zellen.....	19
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
3.2.4	DNA-Restriktion	19
3.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	20
3.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	20
3.2.7	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion	20
3.2.8	DNA-Aufreinigung von PCR-Amplikons	21
3.2.9	Agarosegel-Elektrophorese.....	21
3.2.10	Elution von DNA aus Agarosegelen	21
3.2.11	Sequenzierung von DNA.....	21
3.3	Proteinbiochemische Methoden	23
3.3.1	Xylosyltransferase-Enzymaktivitätstest	23
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	24
3.3.3	Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot.....	24
3.3.4	Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen	25

3.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
3.3.6	Zellaufschluss.....	25
3.3.7	Reinigung von Proteinen mit Hexa-Histidin-Tag	26
3.3.8	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	26
3.3.9	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	27
3.3.10	Reinigung von XylT-II mittels Heparin-Affinitätschromatographie	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Funktionelle Expression der katalytischen Proteindomäne von XylT-II.....	28
4.1.1	Konstruktion eines XylT-II-Expressionsvektors für <i>Pichia pastoris</i>	28
4.1.2	Expression von XylT-II in unterschiedlichen Methanol-verwertenden <i>P. pastoris</i> -Stämmen.....	29
4.1.3	Zeit-abhängige Expression der Xylosyltransferase II	30
4.2	Biochemische Charakterisierung der Xylosyltransferase II.....	31
4.2.1	Analyse der Peptid-OH/Zucker-Verknüpfung	31
4.2.2	Einfluss der XylT-II Aktivität durch Stoffwechselweg-Endprodukte.....	32
4.2.3	Einfluss von Detergenzien auf die Xylosyltransferase II-Aktivität	32
4.2.4	Bestimmung des Temperatur-Optimums.....	33
4.2.5	Ermittlung der Temperaturstabilität	34
4.2.6	Analyse der Monofunktionalität.....	35
4.2.7	Bestimmung der Ionenabhängigkeit und -substitution für XylT-II.....	36
4.2.8	Förderung der Enzymaktivität durch exogene Proteine	37
4.2.9	Einfluss verschiedener Nukleotid-Derivate auf die XylT-II-Aktivität.....	38
4.2.10	Bestimmung des Reduktionsverhalten der Xylosyltransferase II	40
4.2.11	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration	40
4.2.12	Michaelis-Menten Konstanten (K_M) potentieller Akzeptoren	41
4.2.13	Heparin-Bindung der Xylosyltransferase II.....	42
4.3	In-Gel Detektion der Xylosyltransferase II	44
4.3.1	Fraktionierte Präzipitation von XylT-II durch Ammoniumsulfat-Fällung.....	44
4.3.2	Heparin-Affinitätschromatographie	44
4.3.3	Ionenaustauschchromatographie	45
4.3.4	Proteinsequenzanalyse	46
4.3.5	Zusammensetzung der Reinigungstabelle	47
4.4	Rekombinante Darstellung der Xylosyltransferase II in <i>E. coli</i>.....	48
4.4.1	Herstellung und Reinigung von XylT-II als unlösliche Aggregate.....	48
4.4.2	Dialyse von XylT-II in kompatible Laufpuffer für eine Heparin-Bindung	49
4.5	Heterologe Expression von XylT-II-Fragmenten als GST-Fusionsproteine	51
4.5.1	Klonierung, Expression und Reinigung von XylT-II-Fragmenten als GST-Fusionsproteine	51
4.5.2	Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter GST/XylT-II-Fusionsproteine.....	53
4.5.3	GST-Detektion durch enzymatischen CDNB-Aktivitätstest	54

4.6	Analyse der Heparin-Bindestelle der XylT-II durch Produktion von löslichen MBP-Fusionsproteinen.....	56
4.6.1	Klonierung, Expression und Reinigung von XylT-II-Fragmenten als MBP-Fusionsproteine	56
4.6.2	Heparin-Bindung von gereinigten MBP/XylT-II-Fusionsproteinen	57
4.6.3	Produktion von MBP/XylT-II-Fusionsproteinen im MBP-defizienten Stamm ER2507	58
4.6.4	Produktion verlängerter MBP/XylT-II-Fragmente in ER2507	59
4.6.5	Expression und Reinigung von MBP/XylT-II-Fragmente in CAG629.....	60
4.6.6	Ligandenschutztest durch Inkubation mit Heparin	61
4.6.7	Bestimmung der Proteinstabilität durch Inkubationsstudien	62
4.6.8	Expression von MBP/XylT-II Fusionsproteinen in Rosetta 2(DE3).....	63
5	Diskussion.....	65
5.1	Biochemische Charakterisierung der Xylosyltransferase II.....	65
5.2	Anreicherung und Isolierung der Xylosyltransferase II.....	68
5.3	Analyse der Heparin-Bindestelle von XylT-II aus <i>E. coli</i>	69
5.4	Ausblick	71
6	Abkürzungen.....	73
7	Literatur	75

1 Zusammenfassung

UDP-D-Xylose: Proteoglykan-*Core*-Protein β -D-Xylosyltransferase (EC 2.4.2.16, XylT) initiiert die Biosynthese von Glykosaminoglykan-Seitenketten in Proteoglykanen durch den Transfer der Xylose von UDP-Xylose auf spezifische Serinreste eines *Core*-Proteins. Die Xylosyltransferase II (XylT-II) stellt ein XylT-I-paralogenes Protein dar, dessen enzymatische Aktivität erst vor kurzem bestätigt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vermeintliche katalytische Domäne der XylT-II erstmals in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* heterolog als lösliches, funktionelles Protein produziert und biochemisch charakterisiert. Es wurde die Substratspezifität für diverse potentielle Akzeptoren untersucht und ein modifiziertes Bikunin-Peptid als optimaler XylT-II Akzeptor (K_M 1,9 μ M) bestimmt. Die *Core*-Protein/Zucker-Konfiguration, der Einfluss von Nukleotid-Derivaten, das Temperaturoptimum, die Stabilität, die Monofunktionalität und die Ionenabhängigkeit wurden untersucht und dabei u. a. die Notwendigkeit für bivalente Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen für die enzymatische Aktivität ermittelt. Es wurde eine Inhibition der XylT-II durch Stoffwechselweg-Endprodukte, vornehmlich durch Heparin festgestellt und eine Einflussnahme basischer Proteine wie Histone und Protamine eruiert.

Die XylT-II konnte aus 40 Liter *P. pastoris*-Kulturüberstand durch eine Kombination von Ammoniumsulfat-Fällung, Heparin-Affinitätschromatographie und Ionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt werden. Bei einer Gesamtausbeute von 3 % wurde hierbei über eine 7000fache Aufreinigung des Enzyms erreicht und das Produkt massenspektrometrisch als XylT-II identifiziert.

Als weiteres Projekt sollte die Heparin-bindende Aminosäuresequenz der XylT-II identifiziert werden. Voraussetzung dafür war die Herstellung einer ausreichenden Menge an gereinigtem Protein. Aufgrund der strukturunabhängigen Bindung von XylT-I an Heparin wurden in *E. coli* u. a. lösliche XylT-II-Fragmente als Fusionsproteine mit einem MBP-Affinitäts-Tag (Maltose-Binde-Protein) produziert, gereinigt und anschließend deren Heparin-Bindung analysiert. Dabei wurde immunologisch festgestellt, dass zwar eine Bindung verschiedener XylT-II-Fragmente vorhanden war, allerdings konnte wegen des nicht für *E. coli* optimierten Codon-Gebrauchs in der humanen *XylT-II* mRNA keine ausreichende Menge für die weiteren Analysen hergestellt werden.

Summary

UDP-D-xylose: proteoglycan-*core*-protein β -D-xylosyltransferase (EC 2.4.2.26, XylT) initiates the biosynthesis of glycosaminoglycan chains in proteoglycans by transferring xylose from UDP-xylose to specific serine residues of a core protein. Xylosyltransferase II (XylT-II) is a protein homologue to XylT-I, whose enzymatic activity was recently identified.

In this study, the putative catalytic domain of XylT-II was heterologously expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. It was produced as a soluble active protein and biochemically characterized. The substrate specificity for various acceptors was investigated and a modified bikunin peptide was shown to be the optimal XylT-II acceptor ($K_M = 1.9 \mu\text{M}$). The core protein/sugar-linkage type, the influence of nucleotide derivatives, the temperature optimum, the stability, the monofunctionality and the ion-dependency were investigated and among others the necessity for magnesium and manganese ions for the enzymatic activity was confirmed. An inhibition of XylT-II by its biosynthesis pathway end products in particular heparin was detected and an influence of basic proteins like histones and protamines was figured out.

The in-gel detection through purification of xylosyltransferase II was achieved from 40 liters *P. pastoris*-supernatant by a combination of ammonium sulphate precipitation, heparin affinity chromatography and ion exchange chromatography. With a final yield of 3 %, the protein was purified over 7000-fold compared to the original protein sample. The purified product was identified as XylT-II by mass spectra.

Further the heparin-binding sequence of xylosyltransferase II should be identified. Prerequisite for that was the production of a sufficient amount of purified protein. Because XylT-I binds independently of its structure to heparin, *E. coli* was chosen to produce soluble fusion proteins consisting of the solubility enhancement protein maltose-binding-protein (MBP) and XylT-II fragments. The fusion proteins were purified and the binding to heparin was analysed. Although the binding of various XylT-II fragments was immunologically detected, sufficient purified protein could not be produced for further analysis due to the fact that the codon usage of the human *XylT-II* mRNA was not optimized for proper *E. coli* processing.

2 Einleitung

In tierischen Zellgeweben bildet der Raum zwischen Zellen eine Umgebung, die als Extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet wird. Dieser Raum stellt ein komplexes Netzwerk aus zwei Hauptklassen extrazellulärer Makromoleküle dar, die ausschließlich durch die Sekretionsleistung der umgebenden Zellen kreiert wird. Zum einen sind das Kohlenhydratketten in Form von Glykosaminoglykanen (GAG), die kovalent an Proteine zu Proteoglykanen gebunden sind. Zum anderen sind das unlösliche, fibrilläre Proteine mit strukturellen Funktionen (z. B. Kollagen oder Elastin) als auch lösliche Proteine, die adhäsive Funktionen beinhalten (z. B. Fibronectin oder Laminin) [1].

2.1 Proteoglykane

Proteoglykane bilden eine Komponente der Extrazellulären Matrix. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe komplexer Makromoleküle, deren Untereinheiten aus einem Polysaccharid-Anteil, dem Glykosaminoglykan (GAG) und einem Protein-Anteil bestehen. Dabei liegt das Massenverhältniss zueinander bei ca. 95 % GAG zu 5 % Protein [2].

GAG-Ketten basieren auf repetitiven Disaccharid-Einheiten, die an das *Core*-Protein O- oder N-glykosidisch über bestimmte Aminosäure-Reste gebunden sind. In Abhängigkeit vom *Core*-Protein können eine oder mehr als 100 unverzweigte GAG-Ketten an das Peptidrückgrat gebunden sein. Zusätzlich können unterschiedliche Typen an GAGs je nach vorliegendem Zelltyp an das gleiche Protein gebunden sein. Insgesamt sind bisher mehr als 30 verschiedene *Core*-Proteine identifiziert worden, wobei das Molekulargewicht zwischen 10-500 kDa variiert [3].

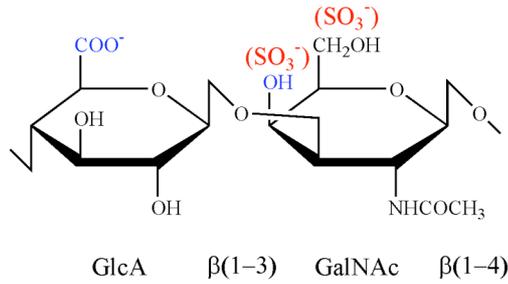
Basierend auf der Sequenz des *Core*-Proteins wurde eine simplifizierte Einteilung in zwei Gruppen vorgeschlagen. Die Klassifizierung unterscheidet zwischen kleinen leucinreichen Proteoglykanen (z.B. Decorin) und den modularen großen Proteoglykanen, welche in zwei Subgruppen unterteilt sind. Dabei wird differenziert zwischen den Hyalektanen, die hyaluron- und lektinbindende Domänen aufweisen (z. B. Aggrecan und Versican) und den nicht hyaluronsäurebindenden Proteoglykanen (z. B. Perlecan) [4]. Manche der *Core*-Proteine beinhalten neben den GAG-Ketten mehrere funktionelle Domänen wie die Hyaluronsäure-Bindungsdomäne, Ca^{2+} -abhängige Lectin-Domänen, Immunglobulin-ähnliche Domänen oder *epidermal growth factor* (EGF)-Domänen [5].

Eines der am besten untersuchten Proteoglykane stellt das Aggrecan dar. Es kommt in großen multimolekularen Aggregaten vor, die aus einer Vielzahl von Proteoglykan-Monomeren bestehen. Diese sind jeweils über ein Link-Protein nicht-kovalent an ein Hyaluronatmolekül gebunden. Annähernd 90% der Masse des Aggrecans ist bedingt durch den Kohlenhydratanteil, welcher prädominant aus Chondroitinsulfatketten, aber auch zu einem geringeren Anteil aus Keratansulfatketten besteht [6, 7]. Aggrecan bildet den größten Teil des Knorpels, wobei durch den anionischen Charakter der Aggrecan-Aggregate ein Turgordruck aufgebaut wird, der verantwortlich für die Kompressionsstabilität ist [7, 8]. Neben der Stabilisierung verschiedener Gewebetypen beinhalten Proteoglykane eine Reihe anderer physiologischer Funktionen. So interagiert z. B. das kleine Proteoglykan Decorin mit den Kollagen-Typen I und II und beeinflusst entscheidend die Kinetik der Kollagenfibrillogenese sowie den Durchmesser der Fibrillen und die Distanz zwischen ihnen [9, 10]. Zudem ist Decorin in der Lage, über sein *Core*-Protein das Cytokin *transforming growth factor beta1* (TGF- β 1) mit hoher Affinität zu binden und somit die Aktivität zu beeinflussen [11-13].

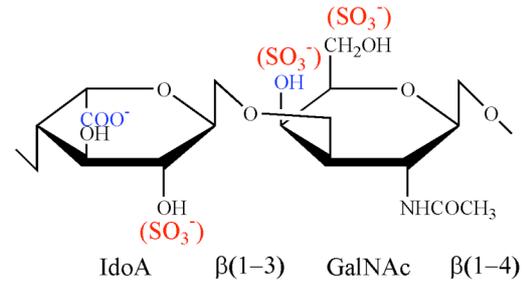
2.2 Glykosaminoglykane

Zu den Glykosaminoglykanen (GAG) zählen Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Heparin, Hyaluronat und Keratansulfat. Sie bestehen aus unverzweigten Kohlenhydratketten, die sich aus alternierenden Disaccharideinheiten zusammensetzen (Abb. 1). Die Disaccharide werden aus einem Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) und einer Uronsäure (D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure) oder im Fall des Keratansulfats aus Galaktose aufgebaut [14]. Häufig treten an den funktionellen Gruppen des Zuckers weitere Modifikationen wie O-Sulfatierungen, Acetylierungen oder Epimerisierungen auf, die sich über die gesamte Kette verteilen und unterschiedliche Positionen einnehmen können.

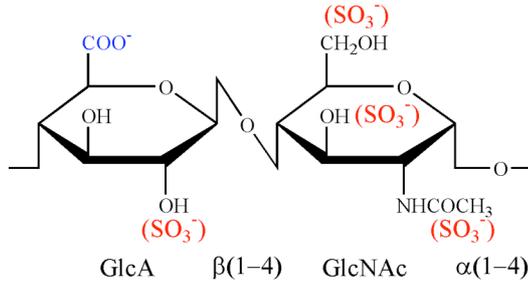
Chondroitinsulfat



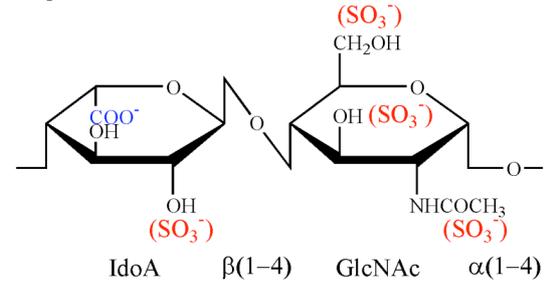
Dermatansulfat



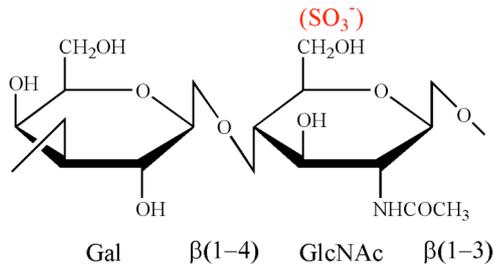
Heparansulfat



Heparin



Keratansulfat



Hyaluronat

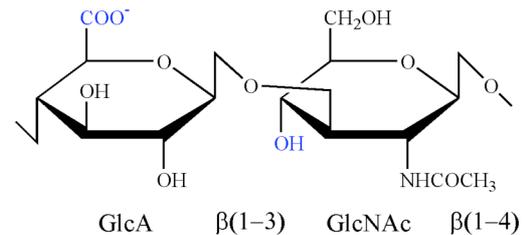


Abb. 1 Struktur diverser Glykosaminoglykane. Jeder der sechs Klassen an Glykosaminoglykanen wird durch Polymerisation spezifischer Disaccharide gebildet mitsamt anschließender Modifikationen, welche die Addition von Sulfatgruppen und die Inversion (blau) der Carboxylgruppe an Position 5 von D-Glukuronsäure zu L-Iduronsäure, beinhaltet. Ubiquitäres Heparansulfat und das Derivat Heparin, stellen eine komplexe Mixtur dar, die aus dem Grad der Sulfatierung (rot) herrührt. Hyaluron ist nicht sulfatiert.

Glykosaminoglykane liegen sowohl als Bestandteil eines Proteoglykans oder in freier Form im Organismus vor [15]. Die Längen der GAG-Ketten sind ebenfalls variabel, so dass trotz der begrenzten Anzahl an Disaccharideinheiten und Modifikationen eine extrem hohe Komplexität der Glykosaminoglykane generiert wird. Durch die gehäuften negativen Ladungen wirken GAGs als Polyanionen und sind so in der Lage Wasser, Kationen und positiv geladene Proteine elektrostatisch zu binden [2].

Die Synthese der Glykosaminoglykan-Ketten an das Proteoglykan-Core-Protein wird durch die sequentielle Addition der vier Monosaccharide Xylose, Galaktose, Galaktose und Glukuronsäure eingeleitet (Abb. 2).

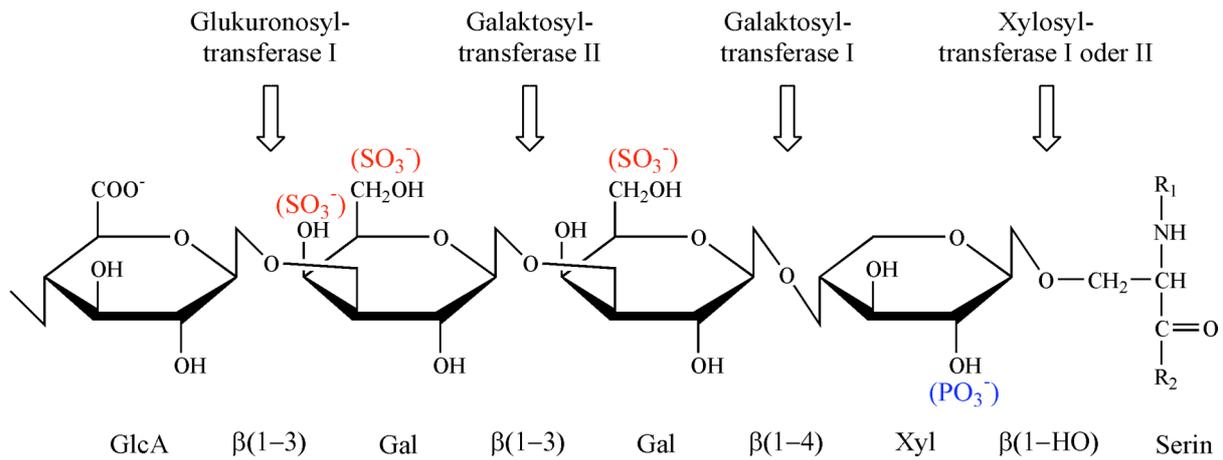


Abb. 2 Struktur des Tetrasaccharid-Linkers und Verknüpfung mit dem Core-Protein. Farblich hinterlegt sind Modifikationen, die beschrieben worden sind.

Eine Ausnahme bildet das Keratansulfat, das über andere Zuckerstrukturen und Aminosäurereste an das Core-Protein gebunden wird [16]. Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese des Tetrasaccharid-Linkers wird durch die Xylosyltransferasen I und II (XylT-I bzw. XylT-II) initiiert und umfasst die O-glykosidische Bindung der Xylose an einen spezifischen Serin-Rest des Core-Proteins. Die weiteren Verknüpfungen von zwei Galaktose-Resten erfolgen durch die Galaktosyltransferasen I und II (GalT-I bzw. GalT-II). Im finalen Reaktionsschritt wird Glukuronsäure durch die Glukuronsäuretransferase I (GlcAT-I) angefügt. Häufig treten auch im Tetrasaccharid-Linker Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Sulfatierungen auf [4, 17].

Durch den ersten Zucker, der an die Tetrasaccharid-Linker-Struktur angefügt wird, findet eine Festlegung der weiteren Reaktionsfolge statt. Hier wird eine Unterscheidung zwischen N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin getroffen. Eine Synthese von Heparansulfat oder Heparin findet nach einer Verknüpfung von N-Acetylglukosamin statt und Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat entstehen bei einem Einbau von N-Acetylgalaktosamin. Zur Vervollständigung der GAG-Kette erfolgt eine Addition weiterer Disaccharideinheiten an die naszierende Kette, bis diese aus bis zu 1000 Einheiten fertiggestellt ist. Dabei werden weitere Modifikationen vorgenommen [15].

Bei Chondroitinsulfat und Dermatansulfat treten neben dem gemeinsamen Aminozucker Unterschiede in der Uronsäure auf, die sich in den Disaccharideinheiten widerspiegeln. Im ersten Fall liegt hauptsächlich Glukuronsäure vor, während bei Dermatansulfat zum größten Teil Iduronsäure zu finden ist [2]. Die Epimerisierung muss jedoch nicht in jeder Disaccharideinheit auftreten, so dass bei Dermatansulfat lange Abschnitte existieren können, die identisch mit denen im Chondroitinsulfat sind. Bei letzterem entstehen durch Sulfatierungen an den C4- oder den C6-Positionen des Aminozuckers die

Konstitutionsisomere Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat. Chondroitinsulfat ist ein wesentlicher Bestandteil des Knorpelgewebes und Dermatan-sulfat wird hauptsächlich in der Haut vorgefunden.

Heparin und Heparansulfat weisen neben N-Acetylglucosamin als zweiten Bestandteil der Disaccharideinheit, eine Glukuronsäure auf, die durch Epimerisierung an C5 zu Iduronsäure umgeformt werden kann. Es kann eine Unterscheidung durch den höheren Modifizierungsgrad bei Heparin und die Modifikationsvielfalt, die bei Heparansulfat ausgeprägter vorliegt, getroffen werden [18]. Die Heparansulfat-Synthese findet in fast allen eukaryontischen Zellen statt [19]; Heparin hingegen wird ausschließlich in Mastzellen gebildet.

Keratansulfat ist aus Galaktose und N-Acetylglucosamin zusammengesetzt und kann sowohl O-glykosidisch über einen Serin-Rest bzw. einen Threonin-Rest als auch N-glykosidisch über einen Asparagin-Rest mit dem *Core*-Protein verbunden sein [20, 21].

Hyaluronat stellt das längste GAG dar und wird im Gegensatz zu anderen GAGs nicht in intrazellulären Kompartimenten, sondern an der inneren Oberfläche der Plasmamembran synthetisiert. Durch das plasmamembranständige Enzym HA-Synthase wird dabei die Addition von jeweils N-Acetylglucosamin und D-Glukuronsäure katalysiert. Hyaluronat unterscheidet sich von anderen Glykosaminoglykanen durch die Tatsache, dass es nicht kovalent an ein Protein gebunden wird und keine Modifikationen der Disaccharideinheiten auftreten. Es besteht aus Glukuronsäure und N-Acetylglucosamin, die als Einheit teilweise sehr oft aneinander gefügt werden, woraus extrem lange Zuckermoleküle mit sehr hohen molekularen Massen resultieren [22-24].

2.3 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind Enzyme, die den Transfer eines aktivierten Zuckers auf ein Akzeptormolekül katalysieren und somit die Synthese von Saccharidketten initiieren bzw. elongieren. Bei dem Akzeptormolekül kann es sich um das nicht-reduzierende Ende einer wachsenden Oligosaccharidkette, um ein Protein oder um ein Lipid handeln [25]. Die meisten Glykosyltransferasen benötigen für die von ihnen katalysierte Transglykosidierung ein bivalentes Kation als Kofaktor, welches in der Regel Mg^{2+} oder Mn^{2+} ist [26]. Aufgrund ihrer Substratspezifität können die Glykosyltransferasen in verschiedene Familien unterteilt werden. Nach der Art des transferierten UDP-, GDP- oder CMP-Zuckers wird zwischen Galaktosyltransferasen, Glukosyltransferasen, Fukosyltransferasen, N-Acetylglukos-

aminyltransferasen, N-Acetylgalaktosaminyltransferasen, Sialyltransferasen und Xylosyltransferasen unterschieden [27]. In Abhängigkeit von der Glykosyltransferase kann der Transfer des Zuckers unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum erfolgen. Durch Campbell et al. [28] wurde eine Kategorisierung der bis dahin bekannten Glykosyltransferasen in 26 Familien vorgenommen. Die Einteilung erfolgte dabei nach Sequenzhomologien, nach Donorzucker und nach Inversion bzw. Retention des Substratzuckers. Mittlerweile ist die Anzahl von Glykosyltransferasefamilien, basierend auf Sequenzanalysen, auf weit über 70 angewachsen.

Abweichend von der deduzierten Aminosäuresequenz weist die Tertiärstruktur der im Golgi-Apparat lokalisierten Enzyme signifikante Homologien auf [29]. Dabei sind die Mehrzahl der Glykosyltransferasen lumenorientierte Typ II Transmembran-Proteine, die eine kurze N-terminale cytoplasmatische Domäne, eine hydrophobe Transmembran-Domäne, eine Stammregion variabler Länge, sowie eine enzymatisch aktive globuläre Domäne aufzeigen. Das pH-Optimum dieser Enzyme liegt zumeist in einem Bereich von pH 5 bis 7, was den pH-Werten in den verschiedenen Kompartimenten des Endoplasmatische Reticulum (ER) und dem Golgi entspricht. Die löslichen Formen der Glykosyltransferasen in Sekreten und Körperflüssigkeiten werden durch eine Proteolyse in der Stammregion generiert [30].

In den vergangenen Jahren konnte bereits eine Vielzahl von Glykosyltransferasen kloniert und deren Kristallstruktur aufgeklärt werden. Anhand der Strukturen konnten zwei verschiedene Tertiärstrukturen identifiziert werden. Glykosyltransferasen vom Typ A besitzen parallele β -Faltblätter, die an beiden Seiten von α -Helizes flankiert werden und verfügen über eine N-terminale Glykonukleotid-Bindungsregion, sowie eine C-terminale Akzeptor-Bindungsregion [18]. Zusätzlich haben Typ-A-Glykosyltransferasen ein konserviertes DxD-Motiv (x = beliebige Aminosäure) gemeinsam, welches durch die Koordination zweiwertiger Kationen an der Bindung des aktivierten Zuckers beteiligt ist. Im Gegensatz dazu zeigen Glykosyltransferasen vom Typ B, die ebenso zur α/β -Familie gehören, zwei Rossmann-ähnliche Domänen, welche durch eine tiefe Spalte getrennt sind. Vor kurzem wurde das Vorhandensein einer dritten Familie postuliert, die allerdings experimentell bislang nicht verifiziert worden ist. In dieser Typ C Familie existiert kein DxD-Motiv und die $\alpha/\beta/\alpha$ -Anordnung unterscheidet sich von denen des A- und B-Typs [31].

Neben den Xylosyltransferasen, welche den initialen Schritt der GAG-Biosynthese katalysieren, sind die Glykosyltransferasen N-Acetylgalaktosaminyltransferase I (GalNAcT) und die N-Acetylglukosaminyltransferase I (EXTL2) entscheidend an der Elongation der GAG-Ketten beteiligt. Nach Ausbildung des Tetrasaccharid-Linkers transferiert die GalNAcT

die Addition von GalNAc und ist somit neben der Glukuronyltransferase II essentiell an der Synthese von Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Ketten beteiligt [32-34]. Das Enzym EXTL2 katalysiert den Transfer von GlcNAc auf den Tetrasaccharid-Linker und initiiert dadurch die Synthese von Heparin und Heparansulfat [35-37].

2.4 Xylosyltransferasen

Die Analyse der Primärstrukturen der UDP-D-Xylose: Proteoglykan-*Core*-Protein β -D-Xylosyltransferasen (EC 2.4.2.26, XylT) klassifiziert diese Enzyme zu der Glykosyltransferase-Familie 14 [28].

Die XylT-I katalysiert den initialen Schritt bei der Bildung des Tetrasaccharid-Linkers und ist somit das Schlüsselenzym der Glykosaminoglykan-Biosynthese [38, 39]. Das Enzym transferiert dabei Xylose von UDP-D-Xylose auf die Hydroxylgruppe bestimmter Serinreste des *Core*-Proteins. Der XylT-I-vermittelte Prozess stellt somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Biosynthese von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin-Ketten dar [40]. Die posttranslationalen Modifikationen der *Core*-Proteine finden nach deren Synthese im Lumen des ER und im Golgi-Apparat statt [41]. Die Xylosyltransferase I unterscheidet sich von anderen Glykosyltransferasen durch die enorme Größe von über 800 Aminosäuren und ihrer Sekretion aus dem Golgi-Apparat in den Extrazellularraum. Für die Freisetzung wird die XylT-I im Golgi-Apparat proteolytisch gespalten und zusammen mit Proteoglykanen sezerniert [42].

Die Xylosylierung von Serinresten durch die XylT-I erfolgt nur innerhalb einer definierten Aminosäuresequenz. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der Modifikationsstellen in Chondroitinsulfat-Proteoglykanen konnte eine Consensus-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren a-a-a-a-Gly-Ser-Gly-a-b-a (a: Asp oder Glu, b: Gly, Asp oder Glu) für die Xylosylierung identifiziert werden [43]. Basierend auf dieser Consensus-Sequenz erfolgte erstmalig die Etablierung spezifischer Testsysteme zur Quantifizierung der XylT-I-Enzymaktivität. Diese erfolgt durch einen radiochemischen Aktivitätstest, bei dem die XylT-I-verursachte Modifikation eines Akzeptorproteins durch Inkorporation von [14 C]-Xylose detektiert wird. Als geeignete Akzeptoren werden Seidenfibroin, rekombinantes Bikunin, und ein Fragment des *Fibroblast growth factor 2* (bFGF) verwendet [44-46]. Unter Anwendung einer HPLC ESI-MS/MS Methode konnte mittlerweile eine schnellere Bestimmungsmethode für XylT-Aktivitäten etabliert werden [47].

Die XylT-I spielt bei verschiedenen physiologischen und pathobiochemischen Prozessen eine Rolle, da es als Schlüsselenzym der Glykosaminoglykan-Biosynthese maßgeblich an der Synthese und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix beteiligt ist. In Untersuchungen konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Xylosyltransferase I zusammen mit Proteoglykanen sezerniert wird und die Quantifizierung der XylT-I-Aktivität im Serum als klinisch-chemischer Marker der Proteoglykansynthese geeignet ist [42]. Ebenfalls erhöhte Serum-Konzentrationen an XylT-I wurden bei Patienten mit der vererbaren Erkrankung Pseudoxanthoma elasticum (PXE) festgestellt [48]. Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist ebenfalls eine erhöhte XylT-I-Aktivität detektierbar [49]. Während der Differenzierung mesenchymaler Zellen in chondrogene Zellen wurde XylT-I als Marker für eine erhöhte Syntheseleistung an Glykosaminoglykanen verwendet [50]. Ein erniedrigter XylT-Gehalt in Serum, der mit einer veränderten Proteoglykan-Biosynthese einhergeht, wurde bei Patienten mit Diabetes Typ 1 und 2 beobachtet [51].

Sowohl die Isolierung der XylT-I als auch die Klonierung der XylT-I cDNA erfolgten erstmalig in dieser Arbeitsgruppe [52, 53]. Von den humanen Xylosyltransferasen existieren die beiden Isoformen XylT-I und XylT-II, die eine Sequenzidentität auf Aminosäure-Ebene von 55 % aufweisen (Abb. 3).

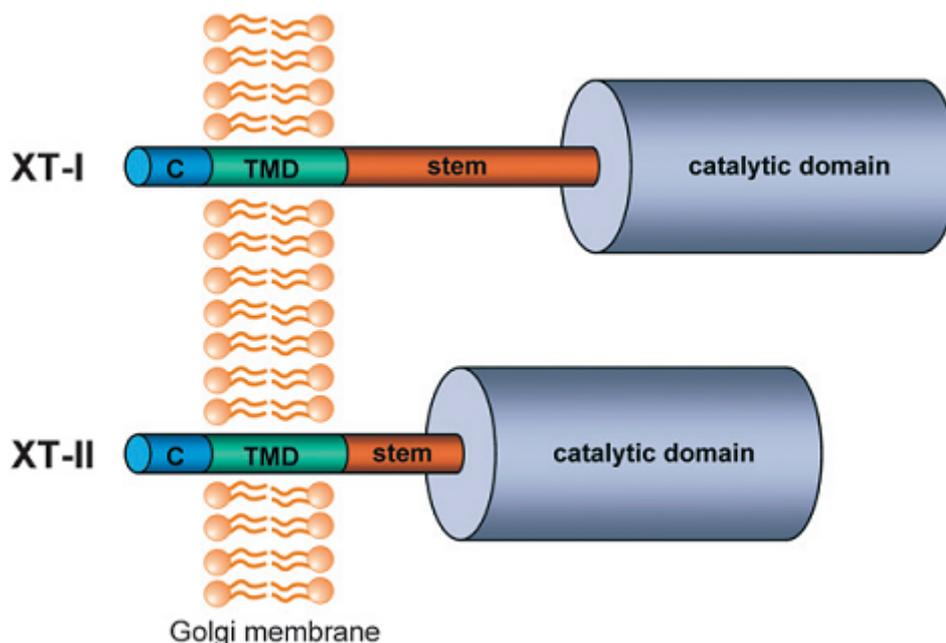


Abb. 3 Schematische Darstellung der Topologie beider Xylosyltransferasen (nach Götting et al., [39]). Beide Xylosyltransferasen besitzen gemäß der postulierten Struktur eines Typ II Transmembran-Proteins eine cytoplasmatische Domäne (C), eine Transmembran-Domäne (TMD) und eine variable Stamm-Region (Stem). Die katalytischen Domänen der XylT-I und XylT-II besitzen einen hohen Grad an Sequenzhomologie.

Innerhalb der C-terminalen katalytischen Domäne beider Proteine zeigt sich eine Sequenzhomologie von über 80 %. Für die XylT-II konnte lange Zeit keine Aktivität festgestellt werden, jedoch wurde hier erst vor kurzem zeitgleich von dieser und zwei anderen Arbeitsgruppen der Nachweis erbracht, dass auch dieses Enzym die Biosynthese von Glykosaminoglykan-Ketten initiieren kann [54-56].

2.5 Glykosaminoglykan/Protein-Interaktionen

Eine biologische Funktion von Glykosaminoglykanen ist deren Interaktion mit Liganden. Neben Glykosaminoglykan/Glykosaminoglykan-Interaktionen [57] basiert die Mehrheit aller Wechselwirkungen auf die von Glykosaminoglykanen mit Proteinen. So binden Heparin und Heparansulfat an diverse Proteine und regulieren deren Aktivität, inklusive die von Enzymen [58-60], Wachstumsfaktoren [61-63], Chemokinen [64-67], Koagulationsfaktoren [68, 69], ECM-Proteinen [70-72], DNA-bindenden Proteinen [73, 74] und bakteriellen bzw. viralen Zelloberflächenproteinen pathogener Organismen [75-78].

Heparin interagiert auf zwei Arten mit Proteinen: Zum einen ähnelt es der polyanionischen Struktur von Nukleinsäuren, weshalb sich DNA-bindende Proteine (Replikasen, Restriktionsendonukleasen) mit Hilfe eines Glykosaminoglykans isolieren lassen. Zum anderen agiert Heparin durch elektrostatische Wechselwirkungen als Affinitätsligand. In beiden Fällen führt ein erhöhter Salzgehalt zur Dissoziation des Heparin/Protein-Komplexes. Die humane Xylosyltransferase I besitzt ebenfalls eine hohe Affinität zu Heparin und es konnte gezeigt werden, dass sich XylT-I durch Bindung an eine Heparin-Matrix chromatographisch reinigen lässt [53, 79].

Die Analyse der Primärstruktur von bekannten Heparin-bindenden Proteinen hat die Präsenz von konservierten Motiven aufgezeigt, durch welche die Bindung an Glykosaminoglykane vermutlich vermittelt wird. Cardin und Weintraub [80] haben zwei basische Aminosäure-*Cluster* identifiziert, in denen die Aminosäuren nach dem Muster [-X-B-B-X-B-X-] oder [-X-B-B-B-X-X-B-X-] vorliegen, wobei B eine basische Aminosäure, meist Arginin oder Lysin und X eine ungeladene oder hydrophobe Aminosäure repräsentieren. Durch molekulares *Modelling* dieser Consensus-Sequenzen konnten Heparin-induzierte α -helikale- oder β -Faltblatt-Strukturen als Umgebung der basischen *Cluster* ermittelt werden. Diese Sekundärstrukturen erlauben die Anordnung von basischen Resten an einer Seite der Helix bzw. Faltblattes, so dass eine geladene Domäne entsteht, an die Glykosaminoglykane binden können. Da allerdings beide Consensus-Sequenzen nicht in allen Heparin-bindenden

Proteinen enthalten sind, haben Margalit und Mitarbeiter [81] einen anderen Mechanismus der Heparin-Bindung von Proteinen postuliert. Dabei ist eine Distanz von 20 Å zwischen basischen Aminosäuren wichtig, die im Gegensatz zum Modell von Cardin und Weintraub, nicht alle auf einer Seite liegen, sondern auf entgegengesetzten. Zur Interaktion mit Heparin kommt es schließlich, indem Heparin nicht seine lineare Struktur beibehält, sondern sich um die Peptid-Achse windet um mit beiden basischen Aminosäure-*Clustern* interagieren zu können.

Untersuchungen mit synthetischen Peptiden, die der Consensus-Sequenz homolog waren, zeigten, dass einzelne Heparin-bindende Sequenzen oft nur eine geringe oder gar keine Affinität für Heparin besitzen, wogegen mehrere Kopien in Form von Concatemeren oder dimerisierten Sequenzen eine hohe Affinität aufweisen [82].

Eine relativ einfache Technik um eine Glykosaminoglykan/Protein-Interaktion qualitativ zu beschreiben, wurde von Vivès et al. [83] entwickelt. Die Funktionsweise ist in Abb. 4 dargestellt. Die Technik, welche zu einer Identifikation von bisher unbekanntem Heparin-bindenden Domänen eines Proteins führt, basiert im Wesentlichen auf drei Schritten: (a) das Immobilisieren eines mit Glykosaminoglykan-interagierenden Proteins an chemisch-aktiviertem Heparin, (b) einem proteolytischen Verdau und (c) einer N-terminalen Sequenzierung von Peptiden, welche an Heparin kovalent gebunden sind.

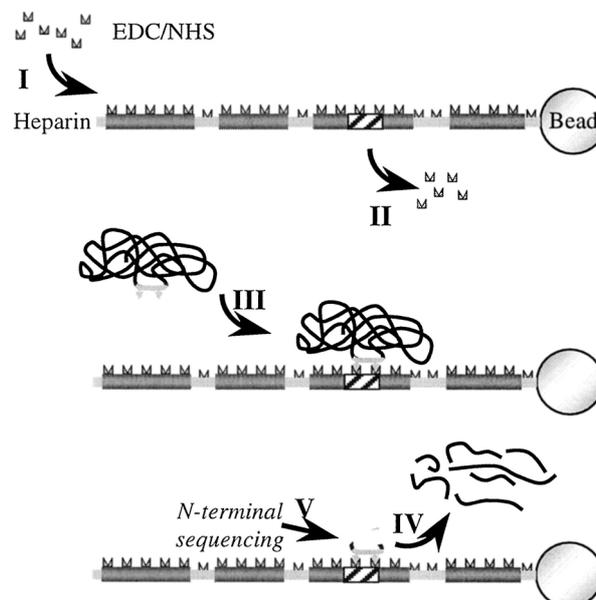


Abb. 4 Strategie zur Kartierung von Heparin-interagierenden Aminosäuren (nach Vivès et al., 2004). An *Beads*-immobilisiertes Heparin wird mit EDC/NHS als Kopplungsreagenzien inkubiert, was zu einer Aktivierung der Carboxylgruppen des Heparins führt (I). Überschüssige *Cross-linker* Reagenzien werden durch mehrmaliges Waschen entfernt (II). Die Heparin-*Beads* werden mit gereinigter Proteinlösung inkubiert, wobei es zu einer Interaktion zwischen der unbekanntem Aminosäuresequenz des Proteins mit dem Heparin kommt. Diese Interaktion führt zur kovalenten Kopplung von primären Aminogruppen mit chemisch-aktivierten Carboxylgruppen des Heparins (III). Ungebundenes Protein wird durch Waschen entfernt und die Heparin-*Beads*

einem proteolytischen Verdau ausgesetzt. Freigesetzte Proteinfragmente werden entfernt (IV), während die an Heparin-gekoppelten Peptide durch N-terminale Sequenzierung als Heparin-interagierende Aminosäuren identifiziert werden (V).

Im ersten Schritt wird eine Heparin-Matrix mit den *Crosslinker*-Reagenzien EDAC und NHS versetzt, die zu einer Aktivierung von Carboxylgruppen des Heparins führt. Die Zugabe einer gereinigten Proteinlösung resultiert in einer Interaktion zwischen den Heparin-bindenden Proteindomänen und dem chemisch-modifizierten Heparin. Durch diese Interaktion kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen Carboxylgruppen und primären Aminogruppen der Aminosäure Lysin.

Nach Entfernung von ungebundenem Protein, wird im zweiten Schritt ein proteolytischer Verdau durch Einsatz von Thermolysin durchgeführt. Thermolysin spaltet vor sperrigen und aromatischen Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Ala, Met, Phe) und wird gefördert nach aromatischen Aminosäuren [84]. Saure Aminosäuren, die sich vor der Spaltstelle befinden, blockieren die Spaltung.

Die Verwendung dieser unspezifischen Protease setzt Fragmente frei, wohingegen Heparin-bindenden Peptide weiterhin kovalent gebunden bleiben. Diese Peptide können im letzten Schritt durch eine N-terminale Sequenzierung identifiziert werden.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Die Xylosyltransferase I katalysiert den initialen Schritt der Proteoglykan-Biosynthese und stellt das Schlüsselenzym beim Aufbau von Bindegewebsstrukturen dar. Ein XylT-I-homologes Protein, welches als XylT-II bezeichnet wird, stellt vermutlich ebenfalls eine Glykosyltransferase dar, deren Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen aber noch völlig unbekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die humane Xylosyltransferase II in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* produziert werden, um zum einen die enzymatische Funktion der Xylosyltransferase II charakterisieren zu können und zum anderen ein Expressionssystem für Glykosyltransferasen zu etablieren, welches geeigneter für *Downstream*-Prozesse (z. B. Proteinreinigung oder Kristallisation) ist. Hohe Expressionsniveaus von Typ-II-Transmembranproteinen werden in der Regel nur erreicht, wenn lösliche Formen ohne den N-terminalen Transmembranteil exprimiert werden. Daher sollte primär eine lösliche Form dargestellt und untersucht werden.

Für den Fall einer erfolgreichen heterologen Expression der XylT-II, sollte im weiteren Verlauf die Reinigung durch Kombination geeigneter chromatographischer Schritte erfolgen.

Weiterhin sollte eine mögliche Glykosaminoglykan/Protein-Interaktion der XylT-I bzw. der XylT-II durch Bestimmung der Bindungsstelle analysiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass XylT-I mit hoher Affinität und konformationsunabhängig an Heparin bindet. Die Heparin-Bindungsstelle sollte dabei über das Verfahren von Vivès et al. (2.5) identifiziert werden. Notwendige Voraussetzung dafür ist die Produktion von XylT-Fragmenten und deren homogene Reinigung. Aufgrund der strukturunabhängigen Heparin-Bindung und der effizienten Herstellung rekombinanter Proteine sollte deswegen *Escherichia coli* als Organismus verwendet werden.

Für den Fall einer erfolgreichen Identifizierung einer definierten Peptidsequenz, sollte diese durch weitere Experimente (Mutagenese, Bindungsstudien) qualitativ und quantitativ untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterien-Stämme und Wachstumsbedingungen

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
TOP10F'	F' { <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10 (Tet ^R)} <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , λ- <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
Rosetta 2(DE3)	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen
ER2507	F' <i>ara-14 leuB6 fhuA2 Δ(argF-lac)U169 lacY1 glnV44 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-5 Δ(malB) zjc::Tn5(Kan^R) Δ(mcrC-mrr)</i> _{HB101}	New England Biolabs
CAG629	F' <i>lacZ(am) pho(am) lon supC(ts) trp(am) rpsL rpoH(am)l65 zhg::Tn10 mal(am)</i>	New England Biolabs

E. coli-Zellen wurden in sterilem Luria Broth-Medium (LB) inkubiert, welches 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 1,0 % NaCl enthielt. Low-Salt-LB-Medium, welches in Kombination mit dem Selektionsmarker Zeocin verwendet wird, beinhaltet einen reduzierteren Natriumchlorid-Gehalt (0,5 %). Nach Zugabe aller Substanzen wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Festes LB-Medium wurde durch Zusatz von 1,5 % Agar erreicht. *E. coli*-Zellen wurden aerob bei 37 °C inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte (λ 600 nm) detektiert. Um transformierte Zellen auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz zu selektionieren, wurden die entsprechenden Antibiotika in autoklaviertes und abgekühltes Medium hinzugefügt.

3.1.2 Hefe-Stämme und Wachstumsbedingungen

Stamm	Genotype	Phänotyp	Quelle/Referenz
X-33	Wildtyp	Mut ⁺	Invitrogen
GS115	<i>his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺	Invitrogen
KM71H	<i>arg4 aox1::ARG4</i>	Mut ^S , Arg ⁺	Invitrogen

P. pastoris-Zellen wurden in sterilem Vollmedium angezogen. Das Vollmedium basierte auf 1,34 % YNB, 4 x 10⁻⁵ % Biotin, 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0 und 1 % Glycerin

(BMGY) bzw. 0,5 % Methanol (BMMY). Während für die Generierung von Biomasse BMGY-Medium verwendet wird, wurde BMMY-Medium stets für die Induktion der Expression benutzt. Um auf transformierte *P. pastoris*-Zellen zu selektionieren, wurde YEPDS-Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose und 1 M Sorbitol) in Kombination mit dem Antibiotikum Zeocin (100 µg/ml) als Selektionsmarker verwendet. Festes Vollmedium wurde durch Zusatz von 1,5 % Agar erreicht. *P. pastoris*-Zellen wurden aerob bei 30 °C inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte (λ 600 nm) detektiert.

3.1.3 Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung/Verwendung
pPICZ α A	Invitrogen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. pastoris</i>-Expressionsvektor für die Sekretion von rekombinanten Proteinen ins Medium - Expression wird durch den Methanol-induzierbaren <i>AOX1</i>-Promotor initiiert - Vektor beinhaltet C-terminales myc-Epitop und Hexa-Histidin-Tag für die immunologische Detektion und Affinitätsreinigung rekombinanter Fusionsproteine
pGEX-6P-1	Amersham Bioscience	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. coli</i>-Expressionsvektor - beinhaltet das Protein Glutathion-S-Transferase (GST) als N-terminal lokalisiertes Fusionsprotein für die Affinitätsreinigung rekombinanter Fusionsproteine, erhöht gleichzeitig die Löslichkeit von Proteinen
pMALc4E	New England Biolabs	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. coli</i>-Expressionsvektor - beinhaltet das Protein Maltose-Binde-Protein (MBP) als N-terminal lokalisiertes Fusionsprotein für die Affinitätsreinigung rekombinanter Fusionsproteine, erhöht gleichzeitig die Löslichkeit von Proteinen
pET28a	Novagen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. coli</i>-Expressionsvektor - beinhaltet N- als auch C-terminalen Hexa-Histidin-Tag für die Affinitätsreinigung rekombinanter Fusionsproteine

3.1.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Homologe Sequenzen zur Zielsequenz sind fett und Restriktionsstellen unterstrichen dargestellt.

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
5' AOX1 sequencing primer	GACTGGTTCCAATTGA CAAGC	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 5'-Bereich der MCS von pPICZα A
3' AOX1 sequencing primer	GCAAATGGCATTCTGA CATCC	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 3'-Bereich der MCS von pPICZα A
malE sequencing primer	GGTCGTCAGACTGTC GATGAAGCC	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 5'-Bereich der MCS von pMAL-c4-E
pGEX 5' sequencing primer	GGGCTGGCAAGCCAC GTTTGGTG	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 5'-Bereich der MCS von pGEX-6P-1
pGEX 3' sequencing primer	CCGGGAGCTGCATGT GTCAGAGG	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 3'-Bereich der MCS von pGEX-6P-1
T7 promoter primer	TAATACGACTCACTAT AGGG	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 5'-Bereich der MCS von pET28a
T7 terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAG CGG	Sequenzierprimer, bindet vektorspezifisch am 3'-Bereich der MCS von pET28a
<i>EcoRI</i> _XT2_(109for)	ATTACGAATTCGGCCT GGAGGAGGACGAG	Amplifikation der Stamm-Region mitsamt katalytischen Proteindomäne von XylIT-II
<i>NotI</i> _XT2_(2595rev)	AAATGCGGCCGCCCTG AGTCGCCCGTCTGC	für die Klonierung in pPICZα A und pET28a
<i>Bam</i> HI_XT2_(1for)	AATTGGATCCATGGTG GCGAGCGCGGAG	Amplifikation von XylIT-II-Fragment 1 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(558rev)	AATTGGATCCCTAGGC GATCTCCTGCTGGCAC	
<i>Bam</i> HI_XT2_(460for)	AATTGGATCCACGGAC AATGGCTTCACC	Amplifikation von XylIT-II-Fragment 2 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(960rev)	AATTGGATCCCTACCA GCCAGGCACCTCTAG C	
<i>Bam</i> HI_XT2_(820for)	AATTGGATCCCACCGG GAGGTGGTGGAGC	Amplifikation von XylIT-II-Fragment 3 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(1350rev)	AATTGGATCCCTAGGT CTCACAGGCCAGGCT	
<i>Bam</i> HI_XT2_(1198for)	AATTGGATCCGACTGG TTCGTGCTGACA	Amplifikation von XylIT-II-Fragment 4 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(1722rev)	AATTGGATCCCTAGGG TGCAGCAGTGGCGGC AT	
<i>Bam</i> HI_XT2_(1591for)	AATTGGATCCCAGCC CTCAAGGCCTAC	Amplifikation von XylIT-II-Fragment 5 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(2091rev)	AATTGGATCCCTACAC	

	CACATAGGTTGGGTC	
	G	
<i>Bam</i> HI_XT2_(1939for)	AATTGGATCCGAGGTT	Amplifikation von XylT-II-Fragment 6 für die Klonierung in pGEX-6P-1 und pMALc4E
	GGCACTGATTGG	
XT2_Stop_ <i>Bam</i> HI_(2598rev)	AATTGGATCCCTACCT	
	GAGTCGCCCGTCT	

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation von kompetenten Bakterien wurde mittels einer Hitzeschock-Inkubation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden kommerziell erworbene, chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen verwendet. Es wurden Aliquots auf Eis aufgetaut und mit 2 µL Ligationsansatz bzw. 1 µL Plasmid-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis, 30 sek bei 42 °C im Wasserbad und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 250 µL vorgewärmtem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde die Bakteriensuspension auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Transformation von *Pichia pastoris*-Zellen

Die Transformation von *P. pastoris*-Zellen erfolgte mit Hilfe der Elektroporation. Zu Beginn der Transformation wurde eine Vorkultur in YEPD-Medium mit Zellen inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Ein Aliquot wurde entnommen, um damit eine Hauptkultur mit einer Start-OD (λ 600 nm) von 0,1 zu inokulieren. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,3 - 1,5 wurde die Zellsuspension geerntet (5 min, 1500 g, 4 °C), zweimal mit sterilem Wasser und einmal mit 1 M Sorbitol-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde final in 500 µl 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert. Pro Elektroporationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension mit 5 µg linearisierter DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporationsbedingungen waren wie folgt: 1500 V, 50 µF, 100 Ω. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert und 1 h bei 30 °C inkubiert. Das Ausplattieren erfolgte auf Zeocin-haltigen YEPDS-Platten.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly [85]. Die Isolierung erfolgte dabei unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (Hilden) sowie des „GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit“ von Sigma gemäß Herstellerangaben.

3.2.4 DNA-Restriktion

Sequenzspezifische DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen wurden anhand den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde in Abhängigkeit von der

eingesetzten DNA-Menge variiert. Das Verhältnis zwischen DNA-Menge (in μg) und verwendeter Einheiten (Units) an Restriktionsendonukleasen wurde auf 1:10 angesetzt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (20 min, 65 °C) oder durch Trennung mittels Agarose-Gelelektrophorese gestoppt.

3.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde durch Zusatz von 1 Unit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) zum Reaktionsansatz gestartet. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung gestoppt (10 min bei 65 °C) und die dephosphorylierten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA, wurde eine 10fach höhere molare Insertkonzentration gegenüber Vektor-DNA gewählt. Die Ligationen erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 20 μl . Der Reaktionsansatz wurde mit 1 Unit T4 DNA Ligase (New England Biolabs) behandelt, mittels eines Temperaturgradienten (30 °C bis 4 °C mit jeweils 30 min pro °C) übernacht inkubiert und mit einer 10-minütigen Hitzeinaktivierung bei 65 °C abgeschlossen.

3.2.7 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde anhand den Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 50 μl angesetzt. Als DNA-abhängige DNA-Polymerase wurde für Klonierungen stets *Pfu*-DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet. Jeder PCR-Ansatz bestand aus 1x PCR Puffer, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,2 μM des entsprechenden Oligonukleotid-Paares, 2,5 mM MgCl_2 , 1,25 Unit *Pfu*-Polymerase und ~100 ng Template-DNA. Die PCR-Reaktion basierte auf folgenden Parametern:

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
	Denaturierung	95 °C	45 sek
25-35	Anlagerung	48-64 °C	45 sek
	Elongation	72 °C	1-3 min
1	Finale Elongation	72 °C	5 min
1	Kühlung	4 °C	∞

Der Nachweis von Plasmid-Konstrukten erfolgte durch Kolonie-PCR. Dafür wurden ganzen *E. coli*-Zellen für die PCR eingesetzt indem Zellen einer Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen wurden und im fertig präparierten PCR-Ansatz resuspendiert worden sind. Als DNA-abhängige DNA-Polymerase diente in diesen Fällen *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*).

3.2.8 DNA-Aufreinigung von PCR-Amplikons

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Aliquots einer PCR-Reaktion wurden zuvor auf ein Agarose-Gel aufgetragen um eine erfolgreiche Amplifikation zu verifizieren.

3.2.9 Agarosegel-Elektrophorese

Analytische und präparative Trennungen von DNA-Fragmenten erfolgten mit horizontaler Agarosegel-Elektrophorese. Je nach Größe der Fragmente wurden 0,5 bis 2,0 %ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer (12,11 g/L Tris-Base, 5,57 g/L Borsäure und 0,37 g/L EDTA, pH 8,4) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor der Auftragung mit 6x DNA-Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 40 % (w/v) Saccharose) versetzt. Als Marker wurde eine 1 kb DNA-Leiter von Invitrogen eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 140 V mit anschließender Darstellung der DNA-Fragmente durch einen UV-Transilluminator.

3.2.10 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Weiterverwendung von aufgetrennten DNA-Fragmenten in Agarosegelen, wurden diese kurzzeitig unter kurzweiligem UV-Licht (λ 254nm) visualisiert, ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.11 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Didesoxyverfahren nach Sanger [86]. Das verwendete „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaktion Kit“ (ABI Prism) enthält neben Desoxynukleotiden (dNTP) auch Didesoxynukleotide (ddNTP), die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert sind. Der Einbau dieser ddNTP-Moleküle bewirkt einen Kettenabbruch, woraus eine lineare Anreicherung der unterschiedlich langen fluoreszenz-markierten Amplikons resultiert. Die Produkte werden anschließend durch

Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzdetektoren in Form eines Elektropherogramms analysiert. Der Sequenzieransatz und das entsprechende PCR-Profil ist nachfolgend dargestellt:

1,5 µl Oligonukleotide (2,5 µM)

2,0 µl *BigDye v1.1 Premix*

4,0 µl *BigDye Sequencing Buffer (5x)*

3-10 µl Plasmid-DNA/PCR-Produkt

ad 20,0 µl (*Rotisolv HPLC-Gradient-Grade*)

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	94 °C	2 min
	Denaturierung	94 °C	10 sek
25	Anlagerung	48 - 60 °C	10 sek
	Elongation	72 °C	4 min
1	Kühlung	4 °C	∞

Die Reinigung der Amplikons erfolgte mit dem „DyeEX 2.0 Spin Kit“ (Qiagen, Hilden).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Xylosyltransferase-Enzymaktivitätstest

Um eine Xylosyltransferase-Aktivität nachzuweisen bzw. zu quantifizieren, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Methode nach Kuhn et al. [47] verwendet einen massenspektrometrischen Nachweis des gebildeten Endprodukts einer Xylosyltransferase-Reaktion. Die Komponenten einer solchen 100 µl Enzymreaktion beinhalten 25 mM MES-Puffer (pH 6,5), 5 mM KF, 12,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 30 µM UDP-D-Xylose, 6,6 µM Akzeptorpeptid (Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein) und 50 µl XylT-haltige Lösung. Standardreaktionen wurden bei 30 °C für 90 min durchgeführt und durch Erhitzen auf 95 °C für 15 min gestoppt. Hitzedenaturiertes Protein wurde abzentrifugiert (20000 g für 30 min) und das xylosylierte Akzeptorpeptid im Überstand für die massenspektrometrische Messung an einer LC-MS/MS Anlage verwendet. Um die Menge an xylosyliertem Akzeptorpeptid zu quantifizieren, wurden definierte Standardlösungen an erworbenen xylosylierten Produkt verwendet.

Der zweite spezifische Nachweistest für Xylosyltransferasen beinhaltet den Einbau radioaktiv-markierter UDP-[¹⁴C]-Xylose in ein Akzeptorpeptid mit anschließendem Nachweis durch einen Szintillationszähler. Dieser Test wurde vornehmlich verwendet, falls andere Akzeptoren als Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein in Benutzung waren. Eine 100 µl Standardreaktion enthielt folgende Komponenten: 25 mM MES-Puffer (pH 6,5), 5 mM KF, 12,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 µM UDP-[¹⁴C]-Xylose (0,01 mCi/ml), 6,6 µM Akzeptorpeptid (Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluorescein) bzw. 30 µl potentieller Akzeptor und 50 µl XylT-haltige Lösung. Nach Zugabe aller Komponenten wurden die Ansätze für 90 min bei 30 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde zwecks Immobilisierung des xylosylierten Produkts auf Nitrozellulosemembranen (Ø 25 mm) übertragen und getrocknet. Das Protein auf den Membranfiltern wurde durch 10%ige Trichloressigsäurelösung präzipitiert und nicht-gebundene UDP-[¹⁴C]-Xylose durch mehrmaliges Waschen mit 5%iger Trichloressigsäurelösung entfernt. Die gewaschene Membran wurde in 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und die Radioaktivität nach 12 h Inkubation bei RT durch den Szintillationszähler gemessen.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich dabei an die zu trennenden Proteine an und überdeckt deren Eigenladung, so dass eine Trennung ausschließlich aufgrund der Größe der Proteine erfolgt. Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgt durch Thiolverbindungen wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol. Für die SDS-PAGE werden vorgefertigte Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) in einem Bis-Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Die Proben werden mit SDS-haltigem Probenpuffer und 0,5 M DTT für 10 min auf 70 °C erhitzt. Um die Größenordnung der Proteine abschätzen zu können, wird neben den Proben ein Proteinstandard (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) mitgeführt. Die Elektrophorese wird für ca. 90 min bei konstanten 200 V durchgeführt. Um Proteinbanden auf dem SDS-PAGE zu visualisieren, wird das Gel 30 min mit Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel mit Entfärber-Lösung (40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure) gewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind und keine Hintergrundfärbung mehr auftritt.

3.3.3 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Vor der spezifischen Identifizierung durch Antikörperhybridisierung wurden gelelektrophoretisch-aufgetrennte Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert. Diese Übertragung erfolgte durch Elektroelution nach dem *Tank-Blot*-System. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 80 min bei einer konstanten Stromspannung von 30 V. Nach dem Transfer werden unspezifische Bindungen abgesättigt, indem die Membran in 3 % Magermilchpulver in TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) für eine Stunde bei RT inkubiert wird. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST gewaschen bevor sie mit einem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit TBST. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte durch die Anlagerung eines mit Meerrettichperoxidase (HRP)- oder eines mit Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten IgG-Sekundärantikörpers (Anti-Maus IgG-HRP bzw. Anti-Maus IgG-AP, Santa Cruz Biotechnology). Die Hybridisierung des Primärantikörpers mit dem Sekundärantikörper wurde durch eine einstündige Inkubation in TBST bei Raumtemperatur erreicht. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Im Falle

einer AP-vermittelten Reaktion beinhaltet der letzte Inkubationsschritt die Zugabe einer NBT/BCIP-Substratlösung (Roche), welche in einer dunkelblauen Präzipitation resultiert. Eine HRP-vermittelte Nachweisreaktion von Proteinen erfolgte durch Chemilumineszenz. Dazu diente Luminol als auch Wasserstoffperoxid als Substratlösung durch dessen chemische Reaktion mit HRP Licht emittiert wird und mittels eines Röntgenfilms visualisiert wird. Die Emission von Licht führt nur an den Stellen zur Belichtung, an denen das gesuchte Protein auf der Membran durch den Primäantikörper erkannt worden ist.

3.3.4 Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Um verdünnte Proteinlösungen zu konzentrieren, wurden aufgrund der guten Ausbeute und Reproduzierbarkeit Proteine nach einer modifizierten Methode nach Tornqvist und Belfrage [87] durchgeführt. Dazu wurde die Probe falls notwendig auf 1 ml aufgefüllt und 25 µl 1 % Natrium-Deoxycholat-Lösung hinzugefügt, vermischt und bei 4 °C für 30 min belassen. Danach wurde 1 ml 12 %ige kalte Trichloressigsäurelösung zugegeben und die Probe anschließend für 20 min bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 20-100 µl 2,5 %ige SDS-Lösung aufgenommen. Nach ca. 10 min bei 37 °C war das Sediment vollständig gelöst und konnte für nachfolgende Prozesse eingesetzt werden.

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch nach der Methode von Bradford [88]. Das Prinzip der Messung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 an Proteinmoleküle, die mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums dieses Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm einhergeht. Die Intensität der resultierenden Blaufärbung ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Als Referenzstandard wurden definierte BSA-Lösungen verwendet anhand derer die Proteinkonzentration der unbekannt Probe bestimmt worden ist.

3.3.6 Zellaufschluss

Zum Zweck eines Zellaufschlusses wurde das Zellpellet in 1/30 des Ursprungsvolumens mit Aufschlußpuffer resuspendiert, 1 Unit/ml Benzonase (Novagen) und 0,2 mg/ml Lysozym zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliches Zellmaterial wurde durch Zentrifugation bei 10000 g, 4 °C und 20 min abgetrennt und der lösliche Proteinüberstand zur weiteren Verarbeitung verwendet. Falls es notwendig war mit *Inclusion bodies* (IB) zu

arbeiten, wurde das unlösliche Material in 8 M Harnstoff versetzt, abzentrifugiert (10000 g, 4 °C und 20 min) und der solubilisierte Überstand für die weiteren Prozesse verwendet.

3.3.7 Reinigung von Proteinen mit Hexa-Histidin-Tag

Die Reinigung von Proteinen mit Hexa-Histidin-Tag aus solubilisierten *Inclusion bodies* erfolgte durch Affinitätsreinigung an Ni²⁺-Nitrilotriacetat-Agarose im *Batch*-Verfahren. Die Affinitätsreinigung basiert auf der Bindung von Histidinreste an bivalente Kationen wie z. B. Ni²⁺-Ionen. In den verwendeten Expressionsvektoren ist der Gensequenz der zu exprimierenden Gene noch eine Sequenz vorgeschaltet, die für sechs aufeinanderfolgende Histidinreste kodiert. Die Proteine werden dadurch mit einem N-terminalen Histidin-Tag produziert. Als eine Affinitätssäule wurde eine Agarose-Matrix verwendet, auf der Ni²⁺-Ionen durch Chelatisierung mittels Nitrilotriacetatgruppen (NTA) gebunden werden. Da die Affinität des Histidin-Tags zu Ni²⁺-Ionen konformationsunabhängig ist, kann eine Proteinreinigung auch unter denaturierten Bedingungen erfolgen. Zu diesem Zweck wird den Puffern 8 M Harnstoff zugesetzt. Für die Reinigung wird der Proteinüberstand über die zuvor mit Puffer A (25 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0) äquilibrierte Matrix geleitet, so dass die mit dem Histidin-Tag versehenen Proteine binden können. Der gebildete Chelatkomplex kann wiederum kompetitiv durch Zugabe von Imidazol gelöst werden. Fusionsproteine wurden immunologisch mit einem murinen monoklonalen Anti-Polyhistidin-Primärantikörper detektiert.

3.3.8 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden im *Batch*-Verfahren mittels einer Glutathion-Sepharose-Matrix gereinigt (Novagen). Die Bindung beruht auf der Affinität von Glutathion-S-Transferase (GST, MW 26 kDa) an immobilisierten Glutathion. Diese Bindung kann durch Verdrängung mit freiem Glutathion wieder gelöst werden. Zur Proteinreinigung wurde der Überstand des Zellaufschlusses über eine zuvor mit Puffer I (PBS, pH 7,4) äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben und 15 min inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen mit Puffer I von der Säule entfernt. Im Anschluss wurde das jeweilige GST-Fusionsprotein mit Puffer II (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8,0) von der Säule eluiert. GST-Fusionsproteine wurden immunologisch mit einem aus Mausstammenden monoklonalen GST-Primärantikörper detektiert.

3.3.9 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von Fusionsproteinen mit N-terminalen Maltose-Binde-Protein (MBP, MW 40 kDa) wurde Amyloseharz (New England Biolabs) als Affinitätsmatrix verwendet. Die Reinigung erfolgte im *Batch*-Verfahren. Dafür wurde der zellfreie Proteinüberstand auf die zuvor mit LowSalt-Puffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) äquilibrierte Matrix gegeben. Die Amylose-Matrix wurde mit LowSalt-Puffer, HighSalt-Puffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) und anschließend mit NoSalt-Puffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) mehrfach gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch kompetitive Verdrängung des MBP von der Matrix durch NoSalt-Puffer + 10 mM Maltose eluiert. MBP-Fusionsproteine wurden immunologisch mit einem murinen monoklonalen MBP-Primärantikörper detektiert.

3.3.10 Reinigung von XylT-II mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Für die Analyse der Heparin-Bindung der Xylosyltransferase II wurden MBP/XylT-II-Fragmente verwendet, die zuvor mittels MBP-Affinitätschromatographie gereinigt worden sind. Als Matrix diente an Agarose immobilisiertes Heparin. Gereinigte MBP/XylT-II-Fusionsproteine wurden im *Batch*-Verfahren zu mit PBS, pH 7,4 äquilibrierten Heparin gegeben und für 15 min inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen in PBS entfernt. An Heparin-gebundene Fusionsproteine wurde durch Zusatz von SDS-haltigem Probenpuffer von der Matrix gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Expression der katalytischen Proteindomäne von XylT-II

4.1.1 Konstruktion eines XylT-II-Expressionsvektors für *Pichia pastoris*

Zu Beginn dieser Arbeit lag die cDNA (2880 bp) für die humane Xylosyltransferase I (Accession: NM_022166.3) bereits kloniert in dem Säugerzell-Expressionsvektor pSS1 [41] vor. Die für die humane Xylosyltransferase II kodierende cDNA (Accession: NM_022167.2) wurde von der Firma Origene (Rockville, USA) erworben. Die DNA-Sequenz (2598 bp) befand sich dabei in dem Säugerzell-Vektor pCMV6-XL6-XylT-II.

Die humanen Xylosyltransferasen sind Proteine, denen die cytoplasmatische Domäne und Transmembran-Domäne nach der Freisetzung von der Membranoberfläche fehlen [54]. Aus diesem Grund wurde für die Konstruktion eines XylT-II-produzierenden Expressionsvektors ausschließlich die Stammregion mitsamt der katalytischen Domäne kloniert. Zudem sind beide Glykosyltransferasen natürlich vorkommende sekretorische Proteine weshalb die Klonierungsstrategie so ausgelegt worden war, XylT-II nicht als cytoplasmatisches sondern als sekretorisches Protein mittels eines *Saccharomyces cerevisiae*-eigenem Sekretionssignal (α -Factor signal sequence) durch *P. pastoris* sezernieren zu lassen. Ein weiterer Vorteil dieser Variante ist, dass Hefen wenig endogene Proteine sezernieren, wodurch eine spätere Reinigung der Xylosyltransferase II erleichtert werden sollte.

Die Amplifikation der Stammregion und der katalytischen Domäne von XylT-II erfolgte mit dem Oligonukleotid-Paar *EcoRI*-XylT-IIfor (5'-tga att acg aat tgc gcc tgg agg agg acg ag-3') und *NotI*-XylT-IIrev (5'-ttt aaa tgc ggc cgc cct gag tgc ccc gtc tgc-3'). Beide Oligonukleotidsequenzen besaßen im 5'-Bereich Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI*, damit eine unidirektionale Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A erfolgen konnte. Die Amplifikation resultierte in ein 2517 bp langes Fragment, welches durch Restriktion/Ligation in die *Multiple Cloning Site* (MCS) von pPICZ α A kloniert worden ist. In dem resultierendem Expressionsvektor pPICZ α A/XylT-II steht XylT-II unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren *AOX1* Promotors. Zusätzlich befindet sich am N-Terminus das Hefe-eigene α -Factor-Sekretionssignal und am C-Terminus ein Hexa-Histidin-Affinitäts-Tag. Das sequenzierte Konstrukt wurde zum Zweck einer homologen Rekombination am genomischen *AOX1*-Locus von *P. pastoris* linearisiert und in

verschiedene Stämme mittels Elektroporation transformiert. Die Selektion von positiv integrierten Transformanten erfolgte durch das Antibiotikum Zeocin.

4.1.2 Expression von XylT-II in unterschiedlichen Methanol-verwertenden *P. pastoris*-Stämmen

Pichia pastoris ist eine methylothrophe Hefe, die fähig ist Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Methanol wird dabei durch das Enzym Alkoholoxidase zu Formaldehyd oxidiert. Die Gegenwart von Methanol führt zu einer Induktion der Expression der Alkoholoxidase, die neben dem *AOX2*-Gen größtenteils durch das *AOX1* Gen bewerkstelligt wird. Als Expressionsstämme standen u. a. X-33 und KM71H zur Verfügung. Sie unterscheiden sich darin, wie schnell sie in Methanol-haltigem Medium wachsen können. Dieser verschiedenartige Phänotyp kommt durch deren genetischen Hintergrund bezüglich dem Vorhandensein beider *AOX*-Gene (X-33) oder der Deletion des *AOX1*-Gens (KM71H) zu Stande. Da nicht vorhersagbar war, welcher Phänotyp die Expression von XylT-II favorisiert, wurden beide Stämme mit dem Plasmid pPICZ α A/XylT-II transformiert, auf Klone selektioniert und deren Aktivität gemessen.

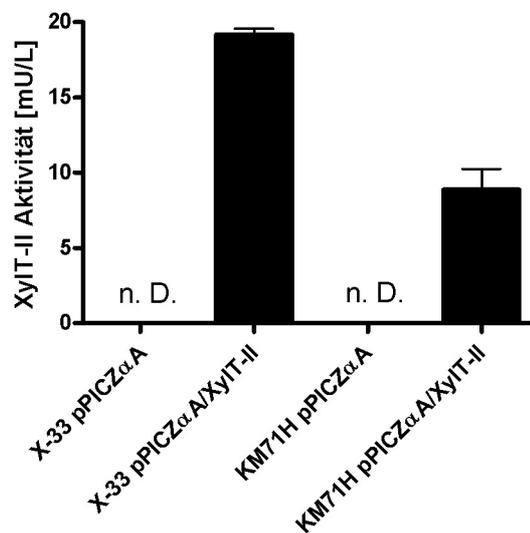


Abb. 5 *Pichia*-Expressionsstämme für XylT-II-Produktion. Die XylT-II-Aktivität wurde 24 h nach Induktion durch Methanol für die Expressionsstämme X-33 und KM71H bestimmt. Dabei wurde die XylT-II-Aktivitäten für Stämme ermittelt, die mit dem Leervektor (pPICZ α A) bzw. mit dem Expressionsvektor (pPICZ α A/XylT-II) transformiert worden sind. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. n. d.: nicht detektierbar, Detektionslimit: 0,05 mU/L

In Abb. 5 ist ersichtlich, dass XylT-II in *P. pastoris* als funktionelles Protein produziert wird. Bei gleicher Inkubationsdauer wird dabei eine höhere XylT-II-Aktivität für X-33 (19,2 ± 0,5 mU/L) als für KM71H (8,9 ± 1,9 mU/L) erzielt. Zusätzlich ist erkennbar, dass eine

Xylosyltransferase-Aktivität weder durch den Organismus selbst noch durch den Leervektor gebildet wird. Die bis dato vermutete Funktion der XylT-II beinhaltet somit eine Xylosyltransferase-Aktivität.

4.1.3 Zeit-abhängige Expression der Xylosyltransferase II

Aus der Literatur war bekannt, dass die Xylosyltransferase-Aktivität im extrazellulären Milieu mit der Zeit zunimmt [42, 89]. Dieser Umstand führte dazu eine Expressionkinetik für XylT-II durchzuführen, um zu ermitteln, ob dieses Protein ebenfalls im *P. pastoris*-Kulturmedium angereichert wird (Abb. 6).

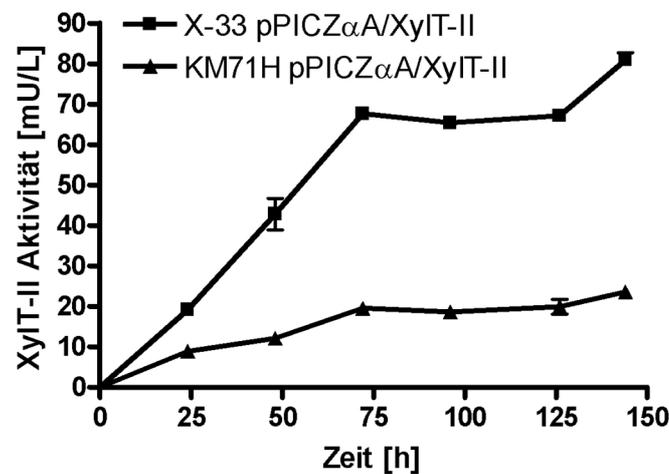


Abb. 6 Expressionskinetik von XylT-II. Die XylT-II-Aktivitäten wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen in den Stämmen X-33 und KM71H gemessen. Die Expressionen wurden durch die tägliche Zugabe von Methanol zu einer finalen Konzentration von 0,5 % induziert. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Während einer sechstägigen Inkubationszeit ist eine Akkumulation der XylT-II-Aktivität im Kulturmedium erkennbar. Für beide getesteten Stämme ist dieser Trend beobachtbar, wobei für X-33 eine Aktivität von $67,6 \pm 1,7$ mU/L und für KM71H eine Aktivität von $19,5 \pm 1,6$ mU/L nach jeweils drei Tagen erreicht wird. Eine längerfristige Inkubation der Zellen über sechs Tage hinaus könnte zu einer weiteren Anreicherung der XylT-II führen.

4.2 Biochemische Charakterisierung der Xylosyltransferase II

4.2.1 Analyse der Peptid-OH/Zucker-Verknüpfung

Die humane Xylosyltransferase I ist eine *Core*-Protein β -D-Xylosyltransferase. Die chemische Konfiguration, die aus der Transferasereaktion resultiert, ist eine β -Verbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Serins und dem Xylose-Zucker. Um den Konfigurationstypus der Xylosyltransferase II-Reaktion zu analysieren, wurde xylosyliertes Endprodukt als Ausgangsprodukt für eine enzymatische Spaltung durch α -Xylosidase und β -Xylosidase sowie durch β -Elimination mittels Natriumborhydrid verwendet. Der verbliebene Anteil an xylosyliertem Ausgangsprodukt wurde anschließend detektiert.

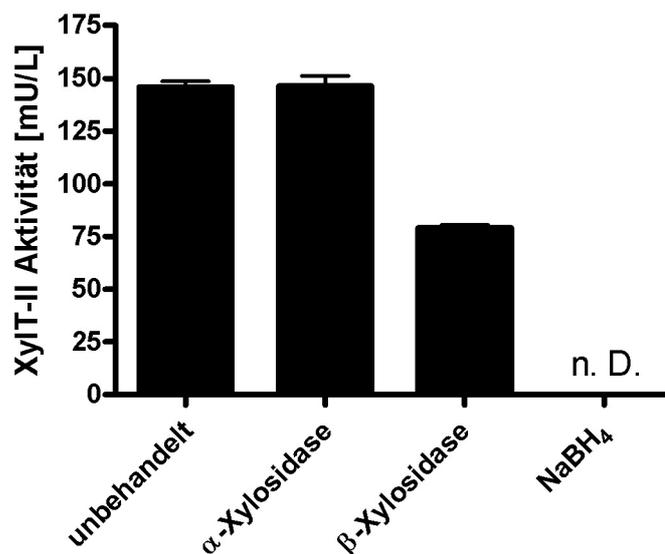


Abb. 7 Analyse der gebildeten Peptid-OH/Xylose-Verbindung. Xylosyliertes Produkt aus einer vorherigen Xylosyltransferase-Reaktion wurde sowohl einer enzymatischen (α -Xylosidase und β -Xylosidase) als auch einer chemischen Spaltungsreaktion durch Natriumborhydrid (NaBH₄) unterworfen. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. n. d.: nicht detektierbar, Detektionslimit: 0,05 mU/L

Aus der durchgeführten Reaktion (Abb. 7) ist ersichtlich das Xylose zwar nicht mit α -Xylosidase ($146,3 \pm 6,9$ mU/L) stattdessen aber mit β -Xylosidase ($79,2 \pm 1,6$ mU/L) und Natriumborhydrid freigesetzt werden konnte, da hier eine Reduktion an xylosyliertem Ausgangsprodukt ($146,1 \pm 3,5$ mU/L) stattfindet. Aufgrund dessen stellt die gebildete Verbindung durch XylT-II eine Serin-OH/ β -Xylose Konfiguration dar.

4.2.2 Einfluss der XylIT-II Aktivität durch Stoffwechselweg-Endprodukte

Viele Proteine, insbesondere Schlüsselenzyme zeigen eine negative Rückkopplung, die durch die Endprodukte des Stoffwechselweges verursacht wird. Da XylIT-I und vermutlich XylIT-II die Schlüsselenzyme der Glykosaminoglykan-Biosynthese sind, wurde hier der Einfluss der XylIT-II-Aktivität in Gegenwart verschiedener Glykosaminoglykane gemessen (Abb. 8).

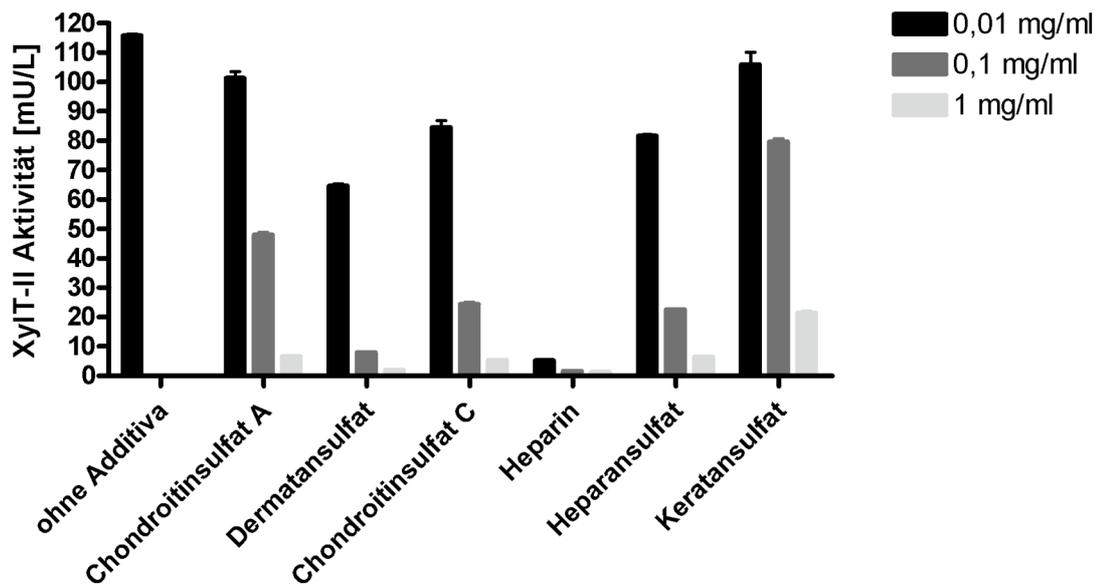


Abb. 8 Produktinhibition der XylIT-II-Aktivität durch Glykosaminoglykane. Die XylIT-II-Aktivität wurde in Gegenwart diverser Glykosaminoglykane und zu den angegebenen finalen Konzentrationen gemessen. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Alle gemessenen Glykosaminoglykane zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der XylIT-II-Aktivität, wobei Heparin den größten inhibitorischen Einfluss besitzt. Bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml zeigt XylIT-II eine Restaktivität von 4,5 % ($5,2 \pm 0,4$ mU/L von ursprünglich $115,7 \pm 1,1$ mU/L). Bei dieser Konzentration vermindert Dermatansulfat die XylIT-II-Aktivität um 44,2 % auf $64,6 \pm 1,0$ mU/L. Der geringste Einfluss bei allen gemessenen Konzentrationen wurde bei Keratansulfat beobachtet. In Gegenwart von 1,0 mg/ml ist eine Restaktivität von 18,6 % vorhanden ($21,5 \pm 1,0$ mU/L).

4.2.3 Einfluss von Detergenzien auf die Xylosyltransferase II-Aktivität

Die Verwendung von Detergenzien kann auf die Funktion mancher Proteine stabilisierend bzw. fördernd wirken. So ist bekannt, dass die Aktivität der Restriktionsenzyme *SalI* und *XhoI* durch Triton X-100 erhöht wird [90]. Aus diesem Grund wurde die XylIT-II-Aktivität in Gegenwart von acht gebräuchlichen Detergenzien gemessen (Abb. 9).

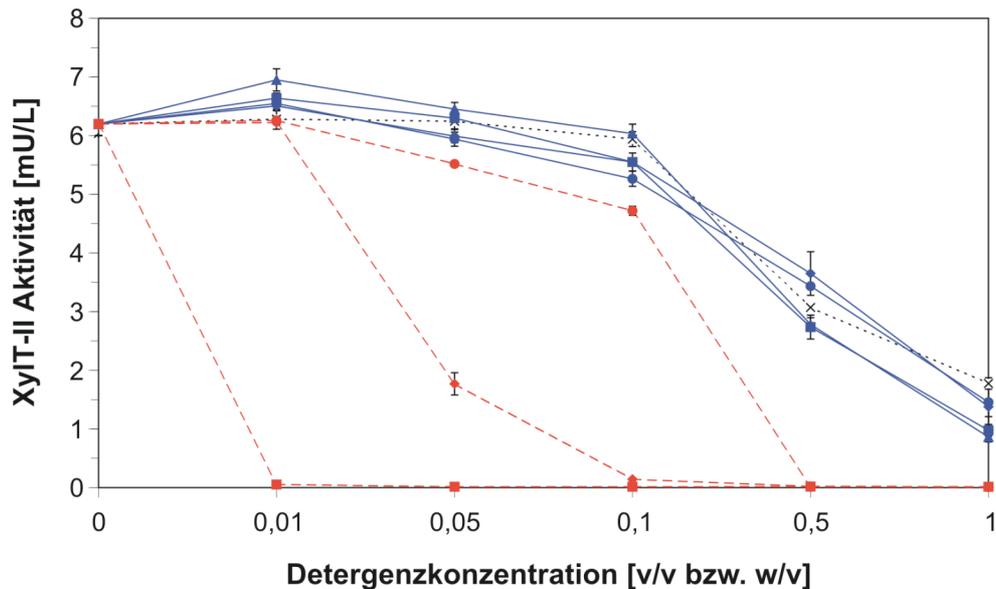


Abb. 9 Einfluss verschiedenartiger Detergenzien auf die XylT-II-Aktivität. XylT-II-Aktivitäten wurden in Gegenwart von acht Detergenzien in einem Konzentrationsbereich von 0 % - 1 % gemessen. Rote, gestrichelte Linien repräsentieren die ionischen Detergenzien (●) N-Lauroylsarcosin, (■) SDS und (◆) Natrium-Deoxycholat. Blaue, durchgezogene Linien illustrieren die nicht-ionische Detergenzien (■) Tween 20, (◆) Triton X-100, (●) NP-40 und (▲) Tween 80. Die schwarze Linie symbolisiert das zwitterionische Detergenz (x) CHAPS. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Es ist erkennbar, dass die Verwendung von 0,01 %iger SDS-Lösung bereits zu einem kompletten XylT-II-Aktivitätsverlust führt. Mit Ausnahme von SDS und Natrium-Deoxycholat, zeigen alle Detergenzien einen marginalen Effekt im getesteten Bereich von 0,01 – 0,1 %. Während für CHAPS, NP-40, Triton X-100, Tween 20, und Tween 80 ein Verlust von 75 % bei erhöhter Konzentration (0,5 %) beobachtbar ist, war die XylT-II-Aktivität bei Verwendung von N-Lauroylsarcosin bereits vollständig blockiert.

4.2.4 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Wilson und Mitarbeiter [91] haben durch deren Analyse von Oxt, ein XylT-I-orthologes Protein aus *Drosophila melanogaster*, ein Temperaturoptimum von 30 °C postuliert. Um das Temperaturoptimum von XylT-II zu bestimmen, wurde die XylT-II-Transferasereaktion bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt.

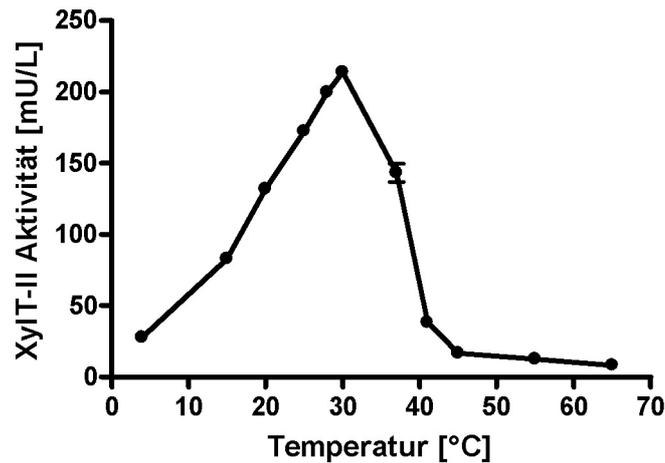


Abb. 10 Bestimmung des Temperaturprofils für XylT-II. Die Bestimmung der XylT-II-Aktivität wurde bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (4°C bis 65°C) durchgeführt. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Das Temperaturprofil der XylT-II-Aktivität in Abb. 10 zeigt gemäß der Van 't Hoff'sche Regel einen Anstieg, welcher in einem Temperaturoptimum bei 30 °C ($213,8 \pm 7,3$ mU/L) resultiert. Bei 37 °C besitzt XylT-II nur 67 % ($143,3 \pm 10,8$ mU/L) der maximal ursprünglichen Aktivität. Eine Inkubation bei 4 °C führt bereits zu einem 12,9 %igen Substratumsatz ($27,7 \pm 1,7$ mU/L), während bei 45 °C nur noch 7,9 % ($16,8 \pm 0,02$ mU/L) Substratumsatz erfolgt.

4.2.5 Ermittlung der Temperaturstabilität

Die Xylosyltransferase II wurde hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität untersucht. Dafür wurden XylT-II-Proben bei verschiedenen Temperaturen (-80 °C, -20 °C, +4 °C, 22 °C und 37 °C) gelagert und regelmäßig die Enzymaktivität bestimmt (Abb. 11).

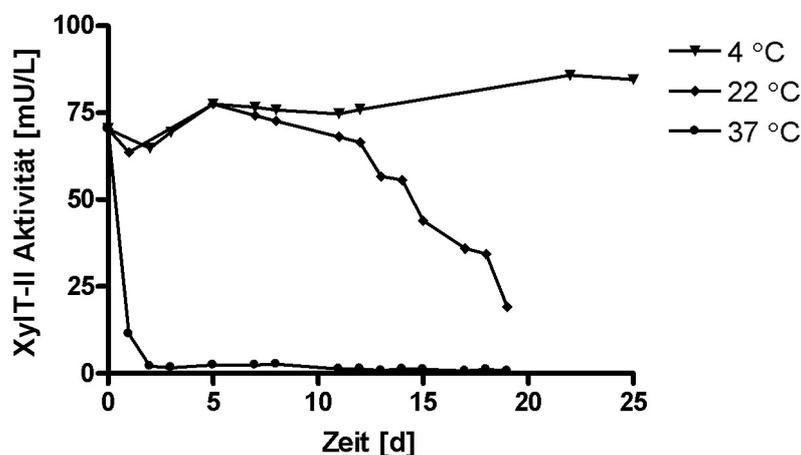


Abb. 11 Temperaturstabilität der XylT-II. XylT-II-haltige Enzymlösungen wurden bei den angegebenen Temperaturen gelagert und die Enzymaktivitäten in regelmäßigen Intervallen bestimmt.

In einem Verlauf von 3 – 4 Wochen hat sich die XylT-II-Aktivität, falls diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden ist, gegenüber einer frisch produzierten Probe nicht verändert. Die Lagerung bei Raumtemperatur resultierte in keinem Verlust der Enzymaktivität innerhalb der ersten zwei Wochen, jedoch war nach drei Wochen mit einem 51,1 %igen Verlust der ursprünglichen Aktivität (34,4 mU/L von 70,4 mU/L) zu rechnen. Eine Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ führte bereits nach einem Tag zu einem Verlust von 84 % (11,5 mU/L).

4.2.6 Analyse der Monofunktionalität

Gilbert und Mitarbeiter [92] haben über eine Sialyltransferase berichtet, die Sialinsäure sowohl an Galaktose als auch an Sialinsäure transferieren kann. Dieses Protein besitzt demnach zwei Aktivitäten, die sich hinsichtlich der verwendeten Zuckerakzeptoren unterscheiden. Da in höheren Eukaryonten zwei Xylosyltransferasen mit gleicher enzymatischer Aktivität existieren, wurde eine mögliche Bifunktionalität hinsichtlich des Zuckerdonors untersucht. Zu diesem Zweck wurde UDP-Xylose durch deren Analoga UDP-Glukose (Glc), UDP-Galaktose (Gal), UDP-Glukuronsäure (GlcA) und UDP-N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) ersetzt und die Transferaseaktivität für zwei unterschiedliche Akzeptoren (Seidenfibroin und Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein) bestimmt.

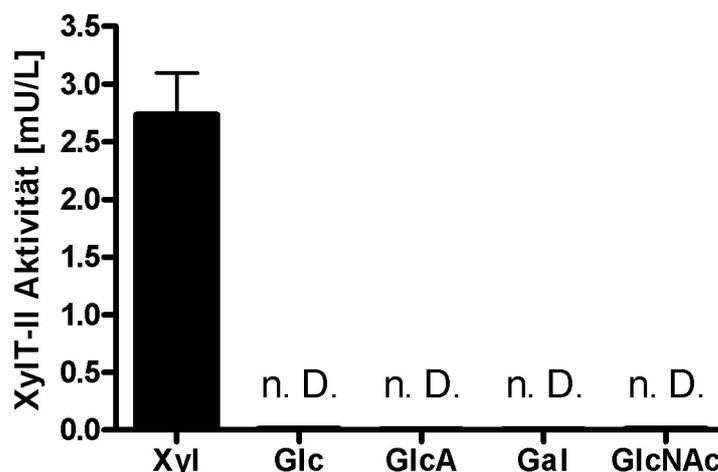


Abb. 12 Analyse der Bifunktionalität der XylT-II hinsichtlich der Donorspezifität. Die XylT-II-Aktivitäten sind exemplarisch für das verwendete Akzeptorpeptid Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein dargestellt. Die dabei untersuchten Zucker sind: Xyl (UDP-Xylose), Glc (UDP-Glukose), Gal (UDP-Galaktose), GlcA (UDP-Glukuronsäure) und GlcNAc (UDP-N-Acetyl-D-Glukosamin). Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. n. d.: nicht detektierbar, Detektionslimit: 0,05 mU/L

Aus Abb. 12 ist ersichtlich, dass XylT-II zwar Xylose an den Akzeptor Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein transferiert, aber keine der anderen potentiellen UDP-Zucker. Eine Transferaseaktivität bei Verwendung von Seidenfibroin als Akzeptor wurde ebenfalls nicht detektiert.

4.2.7 Bestimmung der Ionenabhängigkeit und –substitution für XylT-II

Die meisten Glykosyltransferasen benötigen für ihre katalytische Aktivität bivalente Kationen als Kofaktoren, welche in der Regel Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen darstellen. Aus diesem Grund wurde die Ionenabhängigkeit der Xylosyltransferase II untersucht und dessen mögliche Substitution durch andere Ionenspezies.

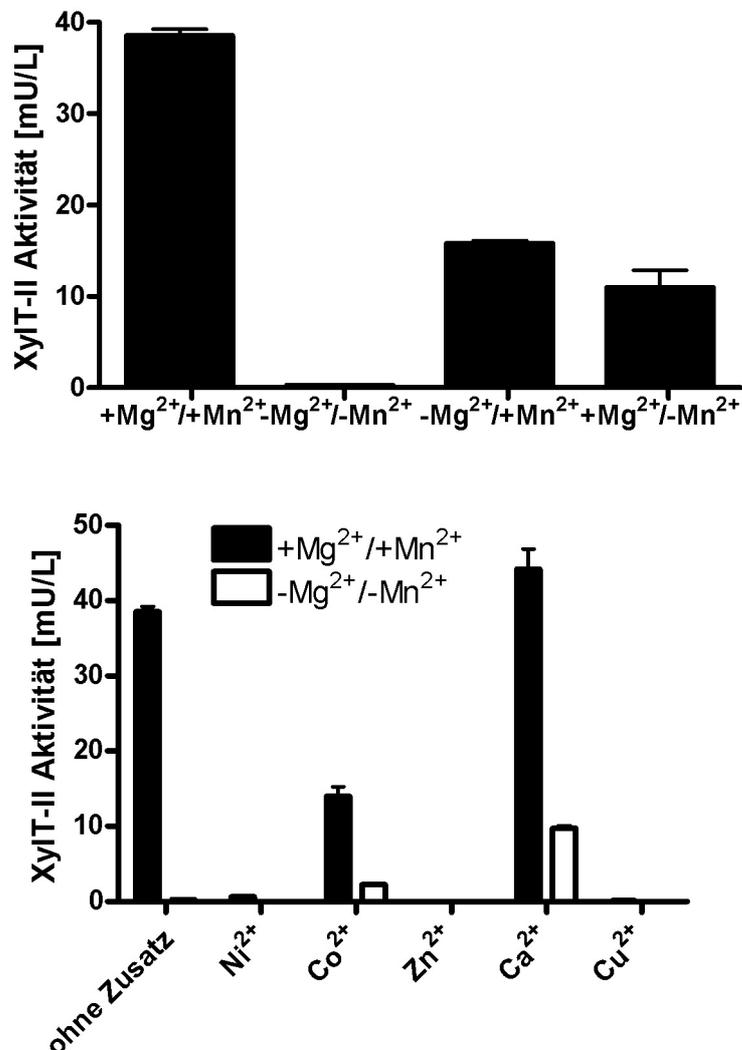


Abb. 13 Analyse der Ionenspezifität für bivalente Ionen. Oberes Bild: Entsalzte XylT-II-Lösungen ($-Mg^{2+}/-Mn^{2+}$) wurden mit Magnesium und Mangan ($+Mg^{2+}/+Mn^{2+}$) versetzt und jeweils mit einer dieser Ionenspezies ($+Mg^{2+}/-Mn^{2+}$ bzw. $-Mg^{2+}/+Mn^{2+}$). Anschließend erfolgte die Messung der XylT-II-Aktivitäten. Unteres Bild: Entsalzte und Magnesium/Mangan-haltige XylT-II-Proben wurden mit diversen bivalenten Ionen versetzt und

deren Einfluss auf die Aktivität gemessen. Die finale Konzentration der getesteten Ionen betrug 5 mM. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

Abb. 13 illustriert, dass die XylT-II-Aktivität abhängig von bivalenten Ionen ist. In Gegenwart von Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen ist eine Aktivität von $38,5 \pm 1,2$ mU/L messbar, während ohne diese Ionen keine Aktivität vorhanden ist. Beide Ionenarten alleine genommen, zeigen nur rund die Hälfte der initialen Aktivität ($-Mg^{2+}/+Mn^{2+}$: $15,8 \pm 0,5$ mU/L; $+Mg^{2+}/-Mn^{2+}$: $11,0 \pm 3,2$ mU/L). Die Zugabe von EDTA oder Natriumcitrat in eine Magnesium-/Mangan-haltige Lösung führte bei 25 mM EDTA zu einer 84 %igen ($7,2 \pm 0,8$ mU/L von $47,3 \pm 2,7$ mU/L) und bei 25 mM Natriumcitrat zu einer 71 %igen ($13,5 \pm 0,9$ mU/L von $47,3 \pm 2,7$ mU/L) Reduktionen der XylT-II-Aktivität. Zusätzlich ist ersichtlich, dass Nickel-, Zink- und Kupfer-Ionen zu einer Inhibition der XylT-II-Aktivitäten führen. In Gegenwart von Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen reduzieren Cobalt-Ionen die XylT-II-Aktivität zu 63 % ($14,0 \pm 2,2$ mU/L von $38,5 \pm 1,2$ mU/L). Die XylT-II-Aktivität kann durch Calcium-Ionen gefördert ($44,2 \pm 4,7$ mU/L) bzw. in Abwesenheit von Mg^{2+}/Mn^{2+} -Ionen teilweise wiederhergestellt werden ($9,8 \pm 0,5$ mU/L).

4.2.8 Förderung der Enzymaktivität durch exogene Proteine

Grebner and Neufeld [93] berichteten, dass Lysozym einen stimulierenden Effekt auf die Xylosyltransferase-Aktivität besitzt. Des weiteren wurde gezeigt, dass Protamin die XylT-I Aktivität fördert [53]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieser und potentiell interagierender Histon-Proteine auf die XylT-II-Aktivität analysiert (Abb. 14).

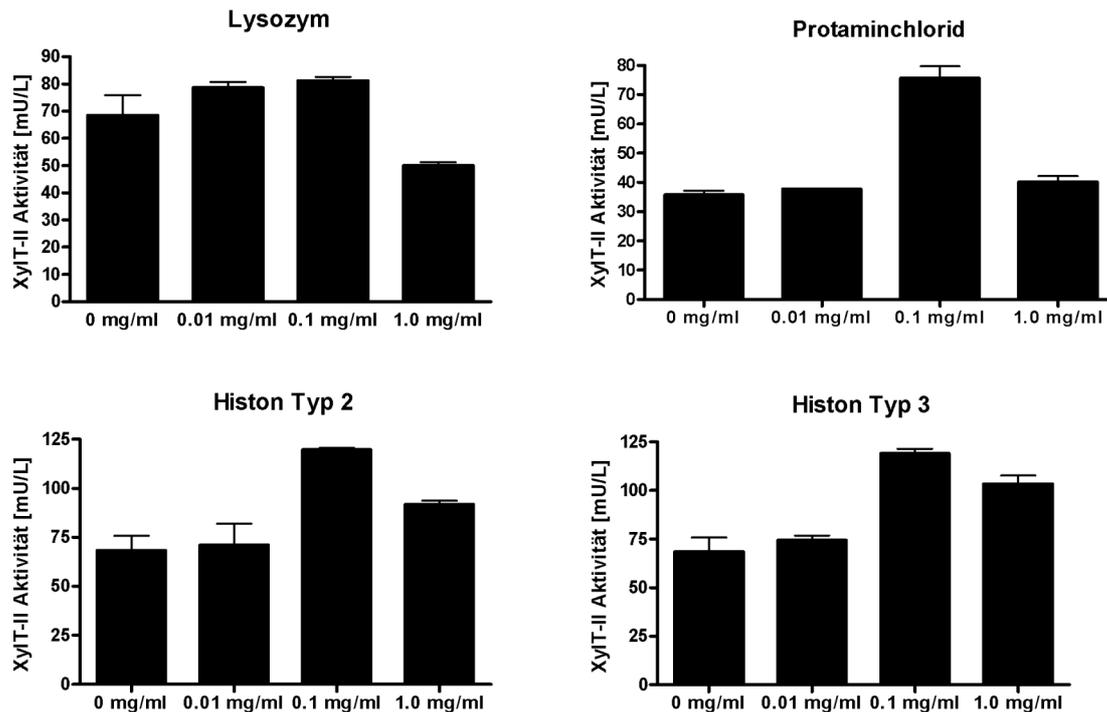


Abb. 14 Einfluss diverser Proteine auf die XylT-II-Aktivität. Die XylT-II-Aktivität wurde jeweils in Gegenwart von Lysozym, Protaminchlorid, Histon Typ 2 und Histon Typ 3 zu den angegebenen finalen Konzentrationen bestimmt. Histon Typ 2 stellt eine heterogene Mixtur aller Histon Subtypen (H1, H2a, H2b, H3 und H4) dar. Histon Typ 3 sind isolierte Histonproteine des Subtypus H1.

Die Zugabe von Protamin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml stimuliert die XylT-II-Aktivität um mindestens das Doppelte ($75,5 \pm 7,2$ mU/L von $35,8 \pm 2,4$ mU/L), wohingegen 10,0 mg/ml die Aktivität um das 4fache verringert ($8,8 \pm 0,2$ mU/L). Während Lysozym keinen fördernden Effekt zu besitzen scheint, führte die Zugabe von 0,1 mg/ml Histon-Protein zu einem 1,75fachen Anstieg ($68,4 \pm 12,9$ mU/L von $119,7 \pm 1,5$ mU/L) der XylT-II-Aktivität.

4.2.9 Einfluss verschiedener Nukleotid-Derivate auf die XylT-II-Aktivität

Für eine erfolgreiche Transferasereaktion benötigt XylT-II ein an UDP-gebundenes Xylosemolekül. Deswegen wurde die XylT-II-Aktivität hinsichtlich diverser Nukleotid-Derivate untersucht, indem die Additiva in verschiedenen Konzentrationen zu der Reaktion zugegeben worden sind (Abb. 15) [94].

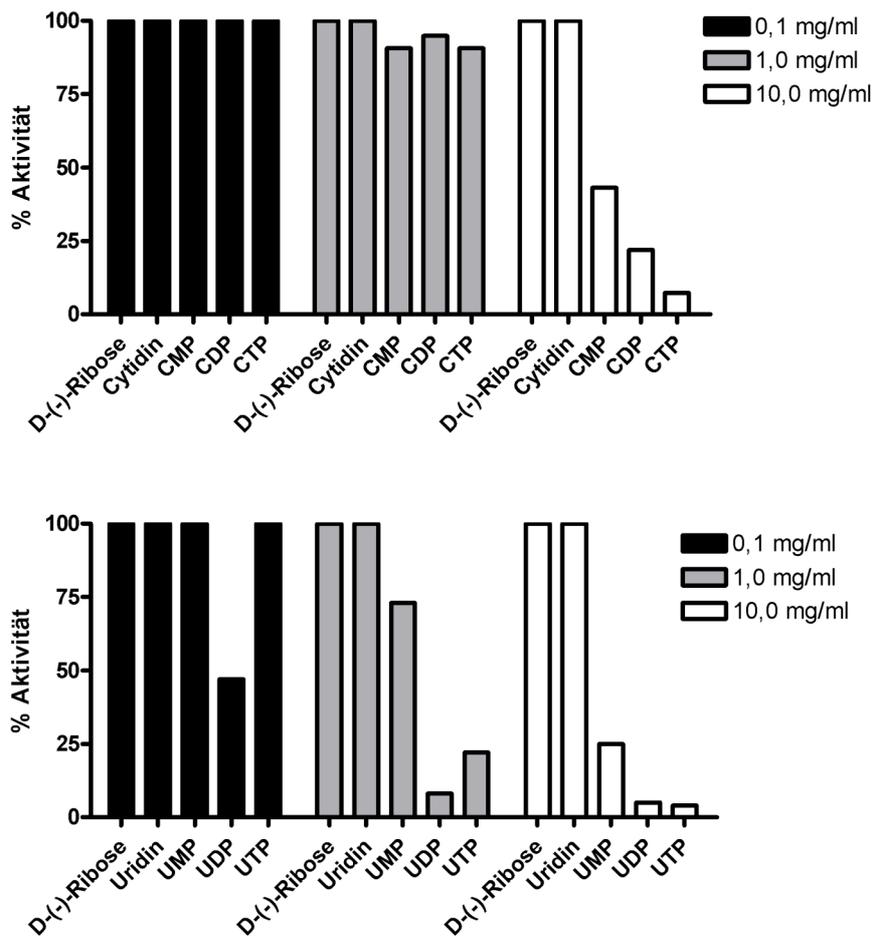


Abb. 15 Untersuchung des Einflusses verschiedener Nucleotid-Derivate. Angegeben sind die relativen XylT-II-Aktivitäten der verschiedenen Nucleotid-Derivate. Als 100 % wurde die XylT-II-Aktivität ohne Additiva gesetzt.

Die Aktivität der XylT-II konnte am effektivsten durch Zugabe von UDP inhibiert werden. Bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml war eine Restaktivität von 47 % vorhanden, wohingegen andere UDP-Derivate keine Inhibition der XylT-II zeigen. Ribose und Uridin zeigen bei keiner der getesteten Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt. Die geringste Inhibition war bei UMP zu beobachten; eine Restaktivität von 25 % konnte bei einer Konzentration von 10,0 mg/ml gemessen werden. Die inhibitorische Wirkung von UTP nimmt eine Zwischenstellung ein.

Derivate, welche Cytidin als Base enthielten, waren weit weniger effektiv als Uridin-Derivate. Bei einer Konzentration von 0,1 – 1,0 mg/ml konnte annähernd bei keinem der getesteten Substanzen eine Inhibition beobachtet werden. Bei der höchsten Konzentration (10,0 mg/ml) war eine Restaktivität von 7 % für CTP vorhanden.

4.2.10 Bestimmung des Reduktionsverhalten der Xylosyltransferase II

Die humane Xylosyltransferase II besitzt 14 Cystein-Aminosäuren. Damit kann dieses Protein sieben potentielle Disulfid-Brücken ausbilden. Das reduzierende Agens β -Mercaptoethanol wurde verwendet, um vorhandene Disulfid-Brücken von XylT-II zu reduzieren. Damit sollte die Notwendigkeit für Disulfid-Brücken für die Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 16).

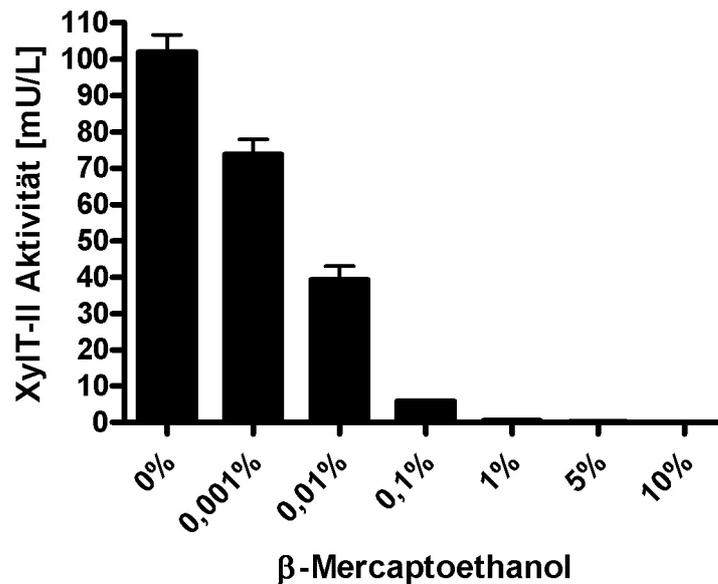


Abb. 16 Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die XylT-II-Aktivität. Verschiedene Konzentrationen an β -Mercaptoethanol wurde zu XylT-II-haltigen Proben hinzugefügt und die Restaktivität bestimmt.

Die Zugabe des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol führt zu einer Verringerung der XylT-II Aktivität. Eine finale Konzentration von 0,01 % führt bereits zu einer Restaktivität von 38,5 % ($39,3 \pm 5,3$ mU/L von $101,9 \pm 6,8$ mU/L). Bei einer Konzentration von 1 % ist eine vollständige Blockierung der XylT-II-Aktivität beobachtbar ($0,5 \pm 0,1$ mU/L). Die Inaktivierung durch β -Mercaptoethanol impliziert die Notwendigkeit von Disulfidbrücken für eine erfolgreiche Transferaseaktivität.

4.2.11 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie wurde das Molekulargewicht von XylT-II bestimmt. Dazu wurde das Ausschlussvolumen einer TSK G3000SW-Gelfiltrationssäule bestimmt und anschließend die Säule mittels Proteinstandards bekannter Größen kalibriert. Eine konzentrierte XylT-II-Probe wurde auf die Säule aufgetragen, Fraktionen gesammelt und deren XylT-II Aktivität gemessen (Abb. 17).

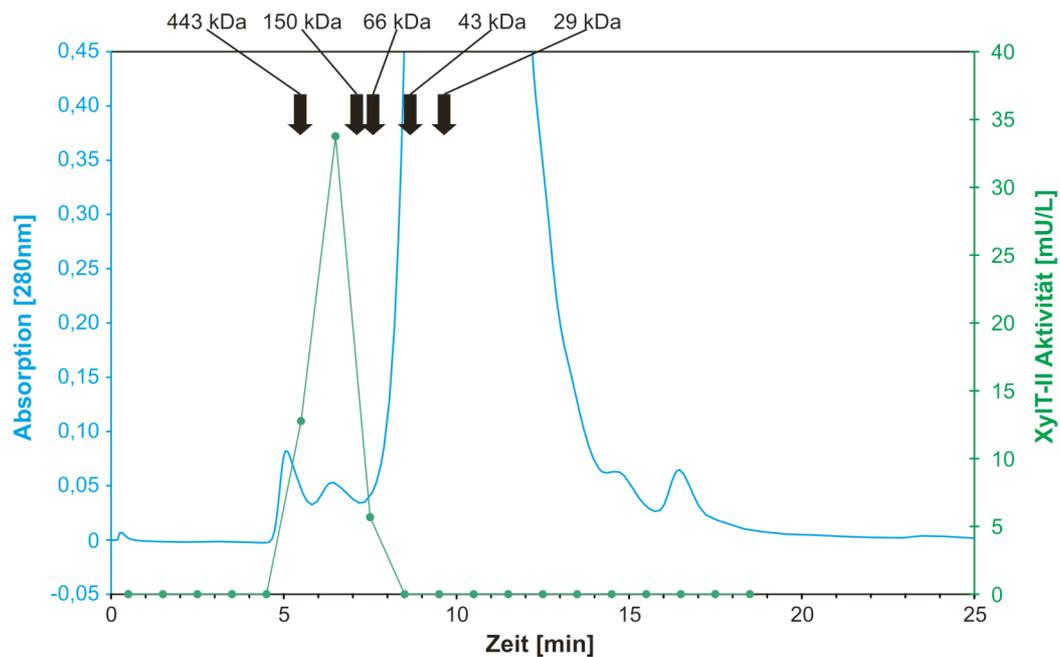


Abb. 17 Molekulargewichtsbestimmung von XylT-II durch Größenausschlußchromatographie. 250 μ l eines \sim 65fach konzentrierten XylT-II-Kulturüberstandes wurde auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (TSK G3000SW). Fraktionen zu je 1 ml wurden gesammelt und die XylT-II-Aktivität bestimmt (grüne Linie). Die Proteinelution wurde durch dessen Absorption bei 280 nm detektiert (blaue Linie). Als Laufpuffer diente 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,5 und 5 % (v/v) Glycerin. Pfeile geben die Elutionszeiten von Proteinstandards bekannter Größen an: Apoferritin (443 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa).

4.2.12 Michaelis-Menten Konstanten (K_M) potentieller Akzeptoren

für XylT-II wurde die Spezifität und Affinität diverser potentieller Akzeptoren untersucht, die alle entweder das G-S-G XylT-I Erkennungsmotiv für eine erfolgreiche Xylosylierung besaßen oder ein in einer sauren Umgebung eingebettetes Serin beinhaltete.

Tab. 1 Ermittlung der K_M -Werte von XylT-II für Akzeptorenproteine und -peptide. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Akzeptor	K_M [μ M]
Bikunin Peptid (Bio-QEEEG <u>S</u> GGGQKK-F)	1,9 \pm 0,9
Bikunin	10,8 \pm 1,2
FGF2[1–24] (PALPEDGG <u>S</u> GAFPPGHFKDPKRLY)	19,1 \pm 4,8
Seide (G <u>S</u> GAGA) _n	738,6 \pm 198,1
L-APP (TENEG <u>S</u> GLTNIK)	>10.000,0
L-APLP2 (SENEG <u>S</u> GMAEQK)	>10.000,0
Orcokinin (NFDEIDR <u>S</u> GFGFN)	>10.000,0
Melittin (GIGAVLKVLTTGLPALIS <u>S</u> WIKRKRQQ)	>10.000,0
Fibrinopeptid A (AD <u>S</u> GEGDFLAEGGGVR)	>10.000,0
IgE C4 Domäne (KTKG <u>S</u> GFFVF)	>10.000,0

C-Type Natriuretisches Peptid (GLSKGCFGLKLD <u>RIGSM</u> SGLGC)	>10.000,0
Calcitonin (8–32, salmon I) (VLGKLSQELHKLQTY <u>PRTNTG</u> SGTP)	>10.000,0

Bio: biotin-; F: -(5-fluoreszein)-CONH₂; FGF2[1-24]: fibroblast growth factor 2 Fragment 1-24; L-APP: leukocyte-derived β -A4-amyloid protein precursor; L-APLP2: leukocyte-derived β -A4-amyloid precursor-like protein

Das Bikunin-homologe Peptid Biotin-QEEEGSGGGQKK-Fluoreszein offenbarte sich als bestes Substrat für XylT-II mit einem K_M -Wert von $1,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Bikunin und FGF2[1-24] waren ebenfalls gute XylT-II Akzeptoren (Bikunin $10,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$; FGF2[1-24] $19,1 \pm 4,8 \mu\text{M}$). Seidenfibroin scheint ein schlechter Akzeptor zu sein ($738,6 \pm 198,1 \mu\text{M}$), wohingegen im Unterschied zu XylT-I, keine Aktivität bei L-APP und L-APLP2 nachgewiesen werden konnte. Beide Proteine sind an der Ausprägung von Alzheimer beteiligt.

4.2.13 Heparin-Bindung der Xylosyltransferase II

Aufgrund der bisherigen Wechselwirkungen von XylT-II mit Heparin wurde getestet, ob diese Affinität als effizienter Schritt für eine chromatographische Proteinreinigung verwendet werden konnte. Dazu wurde eine entsalzte konzentrierte Probe auf eine Heparin-gekoppelte Säule gegeben und das Bindeverhalten anhand des erhaltenen Chromatogramms beurteilt.

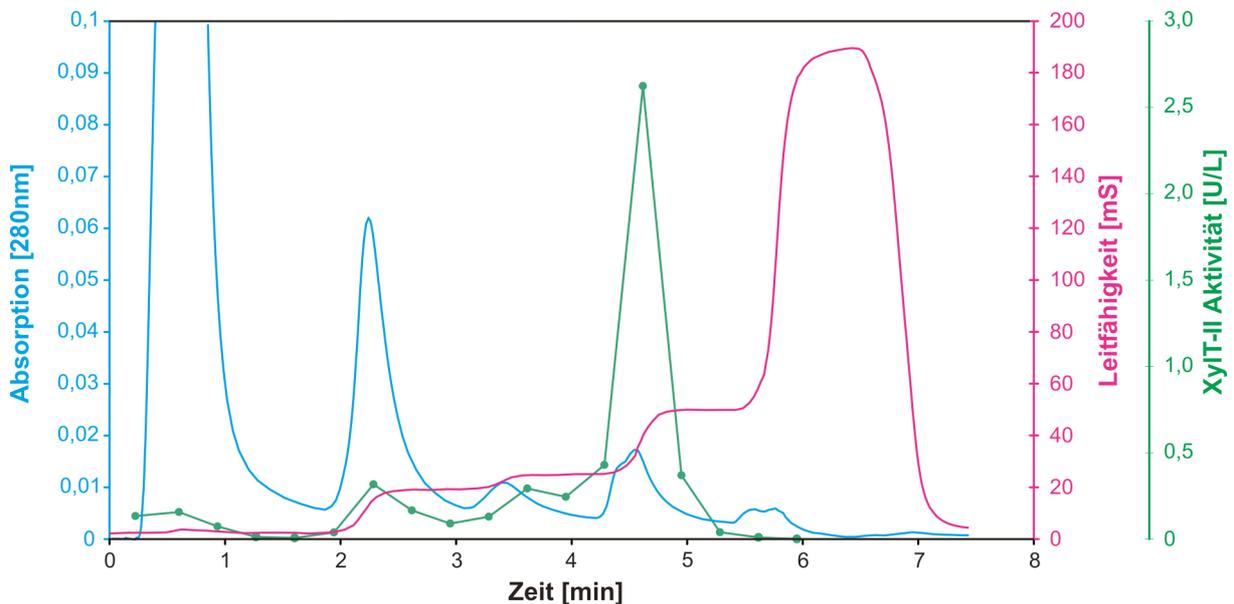


Abb. 18 Heparin-Affinitätschromatographie von XylT-II. Eine POROS 50 HE-Säule (10 cm x 16,0 mm, 50 μm Partikelgröße) wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0 (40 ml) äquilibriert. Nach Injektion einer konzentrierten entsalzten Probe wurde die Säule mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0 (40 ml) gewaschen. XylT-II wurde mittels eines NaCl-Stufengradienten eluiert (rote Linie). Die NaCl-Konzentration wurde wie folgt erhöht: 40 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, pH 6,0 (40 ml); 40 mM Natriumacetat, 200 mM NaCl, pH 6,0 (40 ml); 40 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 6,0 (40 ml) und 40 mM Natriumacetat, 2,88 M NaCl, pH 6,0 (40 ml). Die Proteinelution wurde durch dessen Absorption bei 280 nm detektiert (blaue Linie). Gesammelte Fraktionen wurden hinsichtlich der XylT-II Aktivität gemessen (grüne Linie).

Das Chromatogramm in Abb. 18 zeigt eindeutig, dass fast die gesamte XylT-II Aktivität in einem Elutions-*Peak* erhalten wird. Ausgehend von einer eingesetzten XylT-II-Gesamtaktivität von 5,14 U/L wurden 8,2 % (0,42 U/L) im Durchfluss und in der Waschfraktion gefunden. Die übrigen 91,8 % (4,72 U/L) wurden an Heparin gebunden, wobei 51,0 % (2,62 U/L) als ein *Peak* bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM eluierte. Die Heparin-Affinitätschromatographie wurde als zweiter Reinigungsschritt für die Isolierung der XylT-II verwendet (4.3.2).

4.3 In-Gel Detektion der Xylosyltransferase II

Für die Anreicherung und Isolierung der XylT-II wurden 42 Liter XylT-II-haltiger *Pichia pastoris*-Kulturüberstand produziert. Durch Aufkonzentrierung über eine Polyethersulfon-Membran (MWCO: 5000 kDa) wurde der XylT-II-Überstand auf 1215 ml eingengt.

4.3.1 Fraktionierte Präzipitation von XylT-II durch Ammoniumsulfat-Fällung

Zur effektiven Abtrennung großer Proteinanteile diente die fraktionierte Ammoniumsulfat-fällung. Ammoniumsulfat wirkt stabilisierend auf Proteine, denaturiert diese nicht und der Überstand kann bei Bedarf direkt für die Hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet werden. Vorversuche mit weniger konzentriertem XylT-II-Überstand haben gezeigt, dass XylT-II zwischen 25 % und 60 % präzipitiert (Abb. 19).

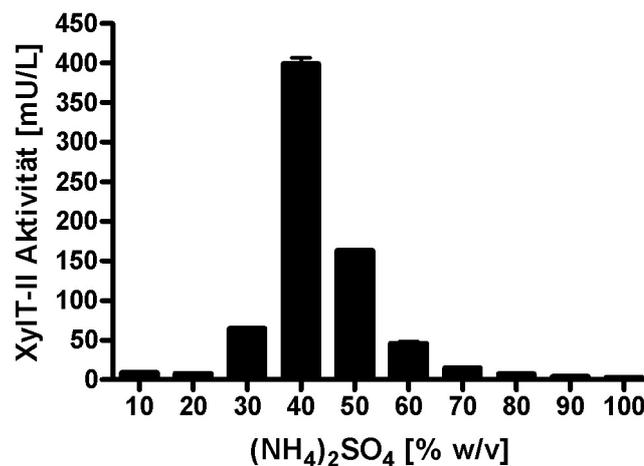


Abb. 19 Fraktionierte Präzipitation von XylT-II. Entsalzte XylT-II-haltige Proteinlösungen wurden mit Hilfe einer Ammoniumsulfat-Zugabetabelle auf die angegebenen finalen Konzentrationen eingestellt. Gemessen wurden die Restaktivitäten des rekonstituierten Proteinpellets bei entsprechend eingestellter (NH₄)₂SO₄-Konzentration.

Das XylT-II-haltige Präzipitat konnte in 150 ml 40 mM Natriumacetat, pH 6,0 gelöst werden. Bei diesem Reinigungsschritt wurden fast 80 % der verunreinigenden Proteine von der Xylosyltransferase abgetrennt.

4.3.2 Heparin-Affinitätschromatographie

Aufgrund der hohen Affinität der XylT-II zu Heparin (4.2.13), wurde eine Heparin-Affinitätschromatographie als zweite Reinigungsstufe gewählt. Im Rahmen einer zyklischen

Chromatographie wurden insgesamt 75 Läufe durchgeführt. Die XylT-II-haltigen Fraktionen der einzelnen Läufe wurden für den nachfolgenden Reinigungsschritt vereinigt, entsalzt und auf 35 ml eingengt.

4.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Eine Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurde wegen ihres hohen Auflösungsvermögens und der großen Proteinbindekapazität als dritte Reinigungsstufe gewählt (Abb. 20).

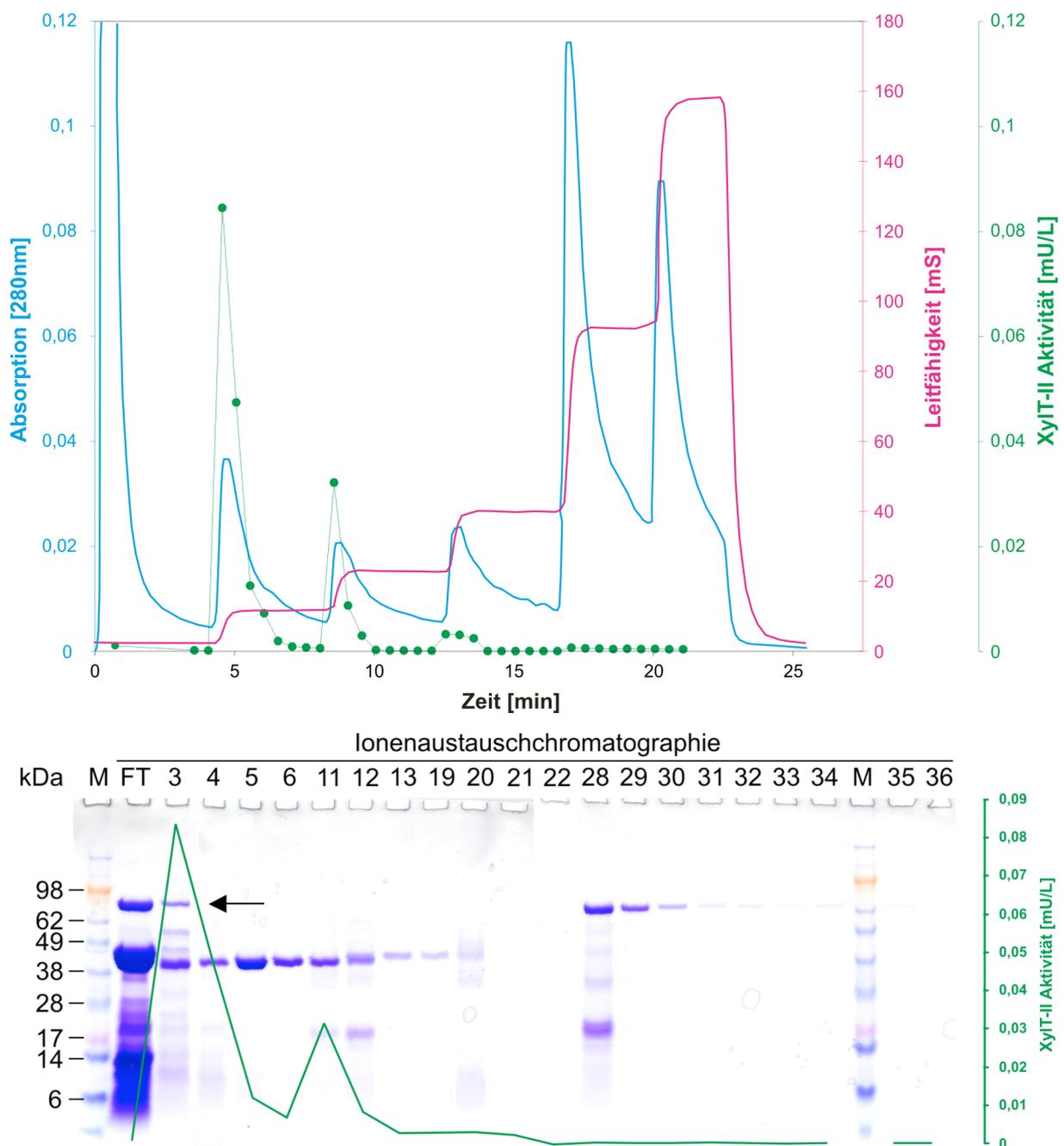


Abb. 20 Ionenaustauschchromatographie und gelelektrophoretische Auftragung XylT-II-haltiger Fraktionen. Oberes Bild: Eine POROS 20 HQ-Säule (10 cm x 4,6 mm, 20 µm Partikelgröße) wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min mit 20 mM Natriumacetat, pH 6,0 (45 ml) äquilibriert. Nach Injektion einer

konzentrierten und entsalzten Probe wurde die Säule mit 20 mM Natriumacetat, pH 6,0 (33 ml) gewaschen. XylT-II wurde mittels eines NaCl-Stufengradienten eluiert (rote Linie). Die NaCl-Konzentration wurde wie folgt erhöht: 20 mM Natriumacetat, 70 mM NaCl, pH 6,0 (42 ml); 20 mM Natriumacetat, 180 mM NaCl, pH 6,0 (42 ml); 20 mM Natriumacetat, 360 mM NaCl, pH 6,0 (42 ml); 20 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 6,0 (33 ml) und 20 mM Natriumacetat, 2 M NaCl, pH 6,0 (25 ml). Die Proteinelution wurde durch dessen Absorption bei 280 nm detektiert (blaue Linie). Gesammelte Fraktionen wurden entsalzt und hinsichtlich der XylT-II-Aktivität gemessen (grüne Linie). Unteres Bild: Nach der letzten Reinigungsstufe wurden Aliquots von ausgewählten Fraktionen mittels SDS-Page analysiert um deren Reinheit zu bestimmen; der hinterlegte Graph gibt dabei die XylT-II Aktivitäten dieser Fraktionen wieder. Der Pfeil gibt die Bande an, welche massenspektrometrisch analysiert worden ist.

Die höchste Menge an XylT-II wurde bei einer NaCl-Konzentration von 70 mM eluiert. Eine weitere XylT-II Elution erfolgte bei 180 mM NaCl. Alle nachfolgende Elutionsschritte führten zwar zu einer Proteintrennung, aber keine beinhaltete eine nennenswerte XylT-II-Aktivität. Wegen der begrenzten Menge an Material wurde nach der Ionenaustauschchromatographie kein weiterer Reinigungsschritt durchgeführt. Nach der letzten Reinigungsstufe wurden Fraktionen mit nachgewiesener XylT-II-Aktivität mittels SDS-PAGE bezüglich ihrer Reinheit untersucht. Dabei wurde eine etwa 95 kDa Bande isoliert und mittels MALDI-TOF/TOF-MS analysiert.

4.3.4 Proteinsequenzanalyse

Eine ~95 kDa Bande wurde aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die proteolytischen Fragmente wurden durch RP-HPLC aufgetrennt. Die daraus erhaltenen Peptide wurden durch Edman-Abbau sequenziert. Fünf Peptide konnten identifiziert und XylT-II zugeordnet werden. Die Peptide waren über die komplette Proteinlänge verteilt (Tab. 2).

Tab. 2 Darstellung der nachgewiesenen Peptide. Die massenspektrometrisch bestimmten Peptidmuster wurden mit dem Programm Mascot analysiert. Die Peptidsequenzen wurden mittels der Datenbank NCBIInr identifiziert. Fünf Peptide mit einem Gesamtscore von 223 konnten der XylT-II (gi11322270) zugeordnet werden. Die Sequenzüberdeckung betrug 7 % und war über das komplette Protein verteilt.

Peptid	gemessene Massen	berechnete Massen
	(M _r)	(M _r)
FLVLPLTFNR	1218,6	1218,7
TNEELVAFLSK	1249,4	1249,7
LLQFWEPLGETR	1487,6	1487,8
EVVELAQGYDNVR	1490,4	1490,7
NFGGLLGPLDEPVAVQR	1781,7	1780,9

4.3.5 Zusammensetzung der Reinigungstabelle

Aufgrund der durchgeführten Reinigungsschritte konnte folgende Reinigungstabelle etabliert werden:

Tab. 3 Übersicht der Reinigungsschritte zur Anreicherung der Xylosyltransferase II aus *Pichia pastoris*. Als Ausgangsmaterial wurde angereicherter *P. pastoris*-Kulturüberstand verwendet.

	Volumen (ml)	Gesamtaktivität (mU)	Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (mU/mg)	Reinigungs- faktor (fach)	Ausbeute (%)
Proteinkonzentrat aus <i>P. pastoris</i>	1215	9,80	29802,1	0,0003	1	100
Ammoniumsulfat- Fällung	150	8,73	6398,3	0,0013	4	89
Heparin-AC	35	3,91	22,3	0,1755	533	40
IEX	3	0,25	0,1	2,3327	7087	3

Heparin-AC: Heparin-Affinitätschromatographie, IEX: Ionenaustauschchromatographie

4.4 Rekombinante Darstellung der Xylosyltransferase II in *E. coli*

Eine wichtige Rolle spielt das Antikoagulanz Heparin. Heparin ist ein stark sulfatiertes Glykosaminoglykan, welches in die Gerinnungskaskade eingreift indem es eine Interaktion mit Protease-Inhibitoren eingeht und die Blutgerinnung hemmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die humane Xylosyltransferase II an Heparin binden kann und auch inhibiert wird. Es war außerdem bekannt, dass XylT-I konformationsunabhängig an Heparin zu binden scheint. Da in den bisherigen biochemischen Untersuchungen keine gravierenden Unterschiede zwischen XylT-II und den publizierten Eigenschaften der XylT-I zu Tage getreten sind, wurde davon ausgegangen, dass XylT-II ebenfalls strukturunabhängig an Heparin bindet. Aus diesem Grund sollte XylT-II heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Anschließend sollte durch Anwendung der Heparin-*Bead*-Methode (2.5) die Heparin-Bindestelle identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Strategien der möglichen Expressionsformen verfolgt, die in den nachfolgenden Abschnitten genauer beschrieben sind.

4.4.1 Herstellung und Reinigung von XylT-II als unlösliche Aggregate

Die heterologe Expression humaner Proteine in *E. coli* resultiert oft in die Produktion unlöslicher aggregierter Proteine, die als *Inclusion bodies* (IB) bezeichnet werden. Die Vorteile der gezielten Produktion rekombinanter Proteine in dieser Form ist deren hohe Reinheit, Ausbeute und einer erleichterten Proteinreinigung. Des weiteren besteht in dieser Strategie die Möglichkeit die komplette cDNA von XylT-II als IB zu produzieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, ein Heparin-Bindemotiv im gesamten Protein zu identifizieren. Um XylT-II als IB zu produzieren, wurde die Stamm-Region mitsamt der katalytischen Proteindomäne durch Verwendung der Oligonukleotid-Sequenzen *EcoRI*_XT2_(109for) und *NotI*_XT2_(2595rev) amplifiziert und unter Benutzung der Restriktionsendonukleasen *NotI/EcoRI* unidirektional in den Expressionsvektor pET28a (Novagen) kloniert. Die DNA steht dabei unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors. Des weiteren enthielt das fertige Konstrukt (pET28a/XylT-IIIB) ein N-terminal lokalisiertes Hexa-Histidin-*Tag* für eine Proteinreinigung unter denaturierten Bedingungen (Abb. 21). Mit diesem Konstrukt wurden Expressionen in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt und die Zellen 4 h Postinduktion geerntet.

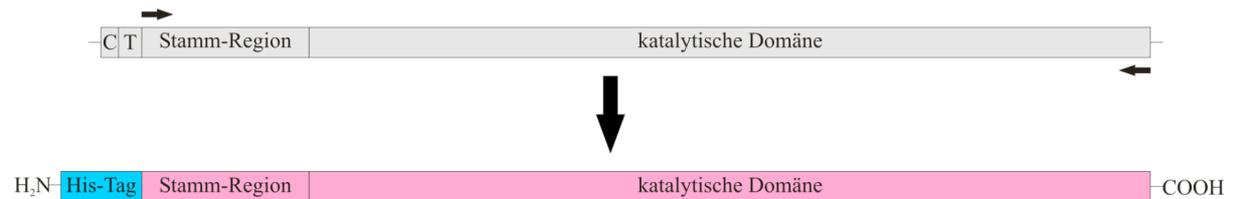


Abb. 21 Schematische Darstellung des klonierten pET28a/XylT-II-Konstrukts. Die waagerechten Pfeile geben den amplifizierten Bereich der XylT-II an, welche für die Klonierung in pET28a verwendet worden ist. C: cytoplasmatische Domäne; T: Transmembran-Domäne; His-Tag: Hexa-Histidin-Affinitäts-Tag

Nach der Zellyse mittels Lysozym wurde die unlösliche Zellfraktion in Puffer A (25 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0) gelöst und unter denaturierten Bedingungen eine Nickel-Chelat-Affinitätsreinigung durchgeführt (Abb. 22). Das gebildete Protein (~95 kDa, Spur 2) wurde bis zur Homogenität isoliert.

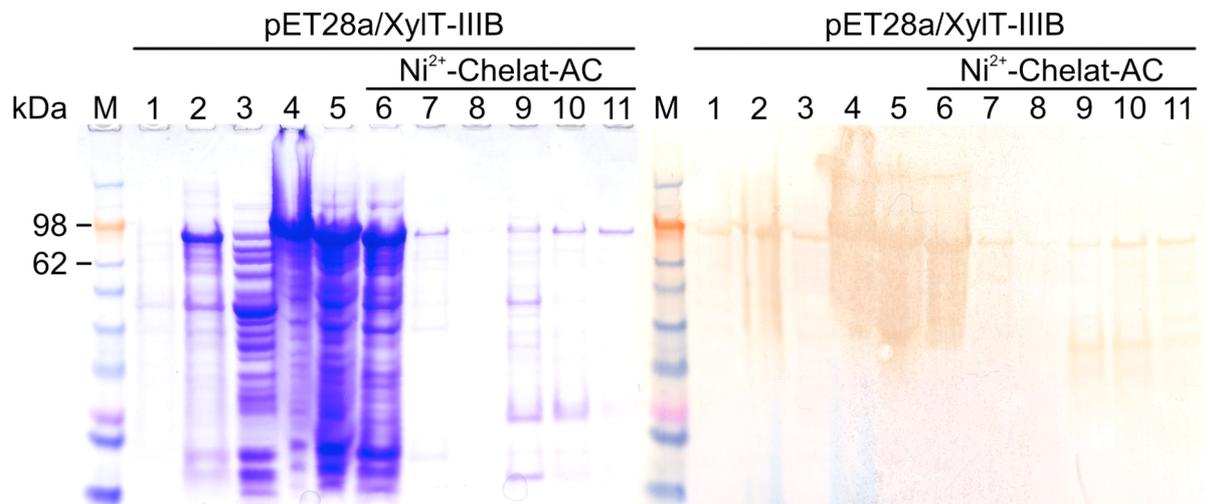


Abb. 22 Expression, Solubilisierung und Reinigung von pET28a/XylT-II mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich auf verschiedenen Stufen der Aufreinigung befindliche Proben. M: Marker, 1: Präinduktion, 2: 4 h IPTG-Postinduktion, 3: löslicher Proteinüberstand; 4: unlösliches Proteinpellet; 5: solubilisiertes Proteinpellet (Puffer A); 6: ungebundenes Protein; 7: 1. Waschschrift; 8: 2. Waschschrift; 9: Elution 1 (Puffer A + 100 mM Imidazol); 10: Elution 2 (Puffer A + 200 mM Imidazol); 11: Elution 3 (Puffer A + 300 mM Imidazol). Rechtes Bild: Immunologischer Nachweis von XylT-II. Hexa-Histidin-markiertes XylT-II wurde durch Inkubation mit einem murinen monoklonalen Antikörper, welcher gegen das Hexa-Histidin-Epitop gerichtet war, detektiert.

4.4.2 Dialyse von XylT-II in kompatible Laufpuffer für eine Heparin-Bindung

Da sich das gereinigte Protein in einem Harnstoff-haltigen Puffer befand und dieses chaotrophe Agenz die Bindung an Heparin verhindert, wurde das Protein gegen verschiedene Puffer dialysiert. In allen getesteten Fällen fiel das Protein sofort aus, sobald der Proteinlösung der Harnstoff entzogen wurde (Abb. 23). Eine Verdünnung der Probe war nicht sinnvoll, da für die Analyse der Heparin-Bindestelle ausreichend Material in konzentrierter Form vorhanden sein musste. Da sich zusätzlich kein Anteil an XylT-II in Lösung befand,

wurde hier davon abgesehen, die Wirkung des denaturierenden Agens durch Verdünnung entgegenzuwirken.

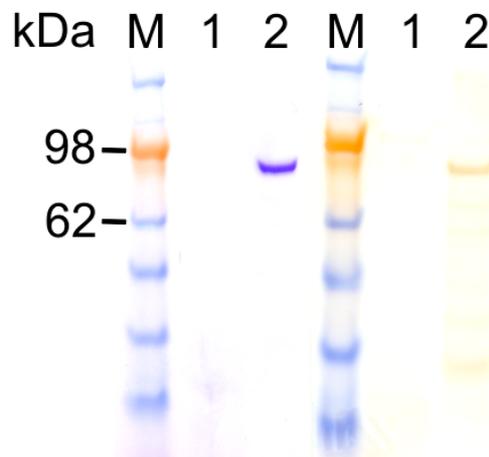


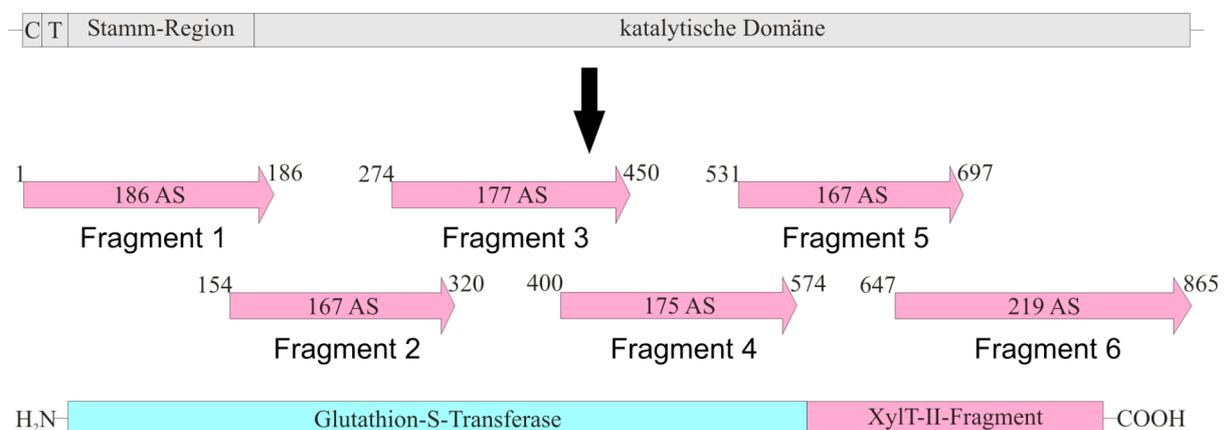
Abb. 23 Darstellung einer dialysierten und fraktionierten XylT-II-Probe. Linke Abschnitt: Gelelektrophoretische Auftrennung einer dialysierten und abzentrifugierten XylT-II-Probe. M: Marker, 1: Überstand der abzentrifugierten XylT-II-Lösung, 2: ausgefallenes XylT-II-Protein. Rechter Abschnitt: Immunologischer Nachweis von XylT-II durch einen Anti-His-Antikörper.

Da keine Möglichkeit erkennbar war das Protein in einen kompatiblen Puffer für eine erfolgreiche Heparin-Bindung zu überführen, wurde die Strategie der IB-Produktion nicht weiter verfolgt.

4.5 Heterologe Expression von XylT-II-Fragmenten als GST-Fusionsproteine

4.5.1 Klonierung, Expression und Reinigung von XylT-II-Fragmenten als GST-Fusionsproteine

Da zu Beginn die Vermutung bestand, dass die Entfernung des Harnstoffs in der IB-Strategie zu einer Aggregation des Proteins führen würde, wurde eine zweite Expressionsstrategie verfolgt. Diese beinhaltete die Klonierung von XylT-II-Fragmenten in einen Expressionsvektor, deren Produktion als lösliche Fragmente und die native Reinigung bis zur Homogenität. Zu diesem Zweck wurden sechs ~500 bp lange XylT-II-Fragmente kloniert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Expressionsvektors pGEX-6P-1 kloniert. Am N-Terminus dieser XylT-II-Fragmente befindet sich die DNA, welche für das Protein Glutathion-S-Transferase kodiert. Die Glutathion-S-Transferase (GST, MW 26 kDa) dient zum einen als Affinitäts-Tag für eine native Reinigung durch Bindung an Glutathion [95], als Epitop für die immunologische Detektion und es erhöht die Löslichkeit rekombinanter Proteine. Alle sechs XylT-II-Fragmente decken die komplette *XylT-II* DNA ab, wobei zusätzlich jedes Fragment eine Überlappung von ~40 AS zum vorherigen/nachfolgenden Fragment besitzt. Durch diese Klonierungsstrategie sollte eine mögliche Disruption eines Heparin-Bindemotivs verhindert werden. Die Transkription der Fusionsproteine wurde durch Zugabe des künstlichen Induktors IPTG induziert. Die Expression erfolgte in dem *E.coli*-Stamm BL21(DE3) und wurde stets bei Raumtemperatur durchgeführt, um den Anteil an potentiell unlöslichem Protein zu reduzieren. In Abb. 24 ist exemplarisch der Nachweis von vier GST/XylT-II-Fragmenten dargestellt.



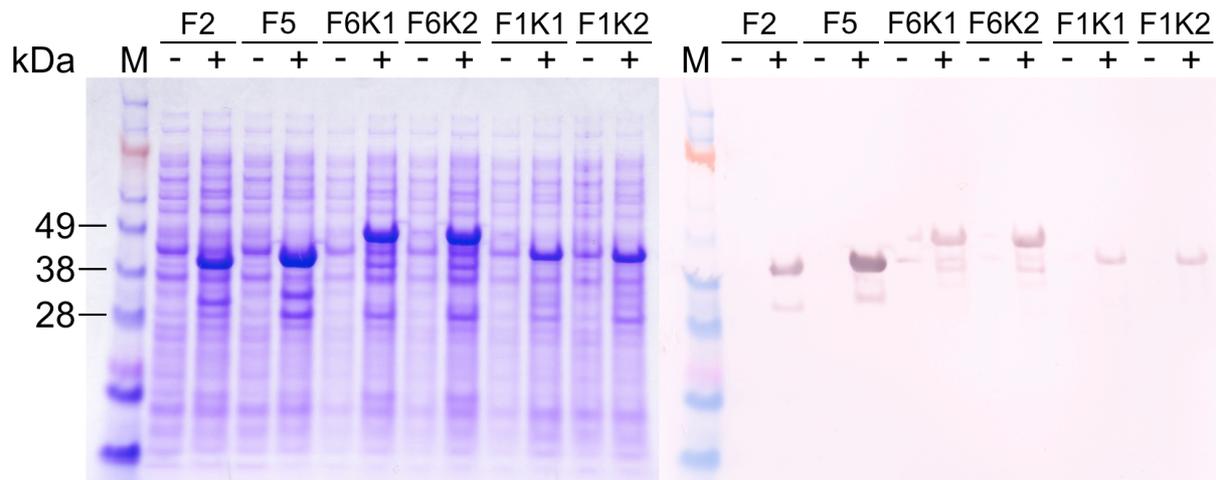


Abb. 24 Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte und Expression diverser GST/XylT-II-Fragmente. Oberes Bild: Dargestellt sind die sechs amplifizierten XylT-II-Bereiche, welche für die Klonierung in pGEX-6P-1 verwendet worden sind. Angegeben ist die Fragmentlänge in Aminosäuren (AS) und die Position der ersten und letzten Aminosäure. C: cytoplasmatische Domäne; T: Transmembran-Domäne. Unteres Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von Komplettlysate sowohl von nicht-induzierten (-) und induzierten (+) Bakterienzellen. Die Bezeichnung F2 zum Beispiel bezieht sich auf das gebildete GST/XylT-II Fragment 2. Die Bezeichnung K1 zum Beispiel bezieht sich auf verschiedene getestete Klone. GST-markiertes XylT-II wurde immunologisch durch Inkubation mit einem murinen monoklonalen Antikörper detektiert, welcher gegen das GST-Epitop gerichtet ist. M: Marker

In allen getesteten Fällen wurde nach IPTG-Zugabe eine prädominante Bande des erwarteten Molekulargewichts gebildet. Der immunologische Nachweis mit einem monoklonalen spezifischen GST-Antikörper zeigt auch, dass es sich dabei um die Fusionsproteine gehandelt hat. Die immunologische Detektion offenbarte für einige GST/XylT-II-Fragmente neben der Hauptbande, Nebenbanden mit geringerem Molekulargewicht. Da diese Nebenbanden ein größeres Molekulargewicht als GST (MW >26 kDa) besaßen, deutete dieser Umstand auf das Vorhandensein eines Proteinabbaus oder Translationszwischenprodukte der *XylT-II*-mRNA an. Translationszwischenprodukte wiederum rühren von der unterschiedlichen Codon-Benutzung der Organismen her.

Obwohl undefinierte Nebenbanden für einige Fragmente erhalten worden sind, wurden einige GST/XylT-II-Fragmente unter nativen Bedingungen über eine Glutathion-Matrix gereinigt. In Abb. 25 ist exemplarisch die Reinigung für die GST/XylT-II-Fragmente 2 und 5 (GST/XylT-II-F2 und GST/XylT-II-F5) dargestellt. Keine der hergestellten Fusionsproteine konnte über Glutathion gereinigt werden, obwohl die Proteine nach IPTG-Induktion produziert und immunologisch detektiert worden sind. Da die Bindung an Glutathion von der richtigen Faltung des GST-Proteins abhängt, lag die Vermutung nahe, dass die Fusionsproteine zwar produziert aber nicht gefaltet und somit wahrscheinlich als unlösliche Aggregate (IB) vorlagen.

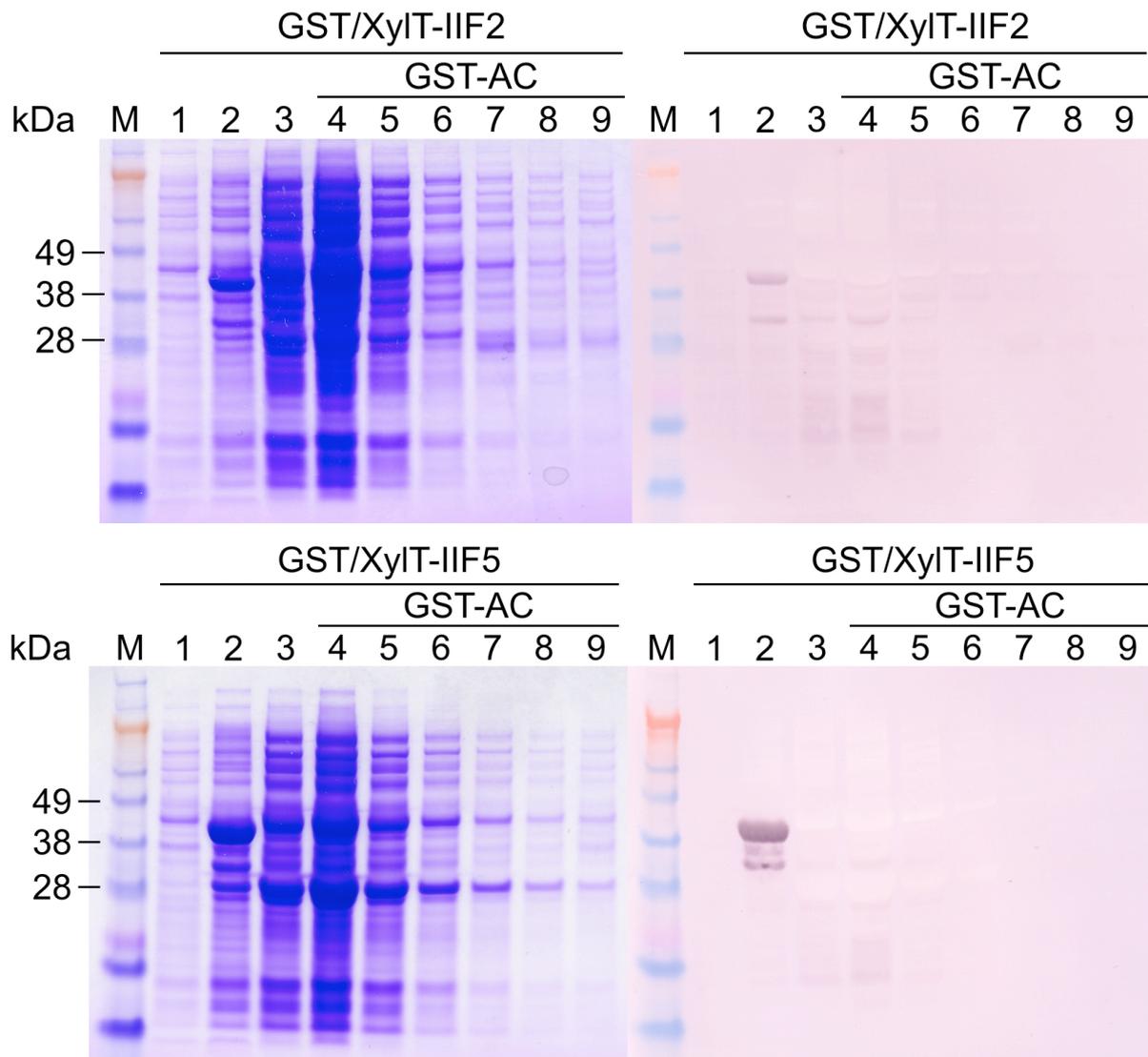


Abb. 25 Expression und Reinigung der GST/XylT-II-Fragmente 2 und 5. Linke Bilder: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich auf verschiedenen Stufen der Aufreinigung befindliche Proben. M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 4 h IPTG-Postinduktion; 3: Proteinlysate (Gesamtprotein); 4: ungebundenes Protein; 5: 1. Waschschrift (Puffer I); 6: 2. Waschschrift (Puffer I); 7: Elution 1 (Puffer II); 8: Elution 2 (Puffer II); 9: Elution 3 (0,5 % SDS). Rechte Bilder: Immunologischer Nachweis der GST/XylT-II-Fusionsproteine. GST-markiertes XylT-II wurde durch Inkubation mit einem murinen monoklonalen Antikörper, welcher gegen das GST-Epitop gerichtet war, detektiert.

4.5.2 Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter GST/XylT-II-Fusionsproteine

Die Unterscheidung zwischen unlöslichen Proteinen und löslichen Proteinen erfolgt durch Zentrifugation im Bereich von 5000 – 12000 g. Dazu wurde exemplarisch Zelllysat mit GST/XylT-II-F5 abzentrifugiert (20 min, 10000 g), der lösliche Proteinüberstand für eine GST-Reinigung verwendet und das unlösliche Protein in 8 M Harnstoff solubilisiert (Abb. 26).

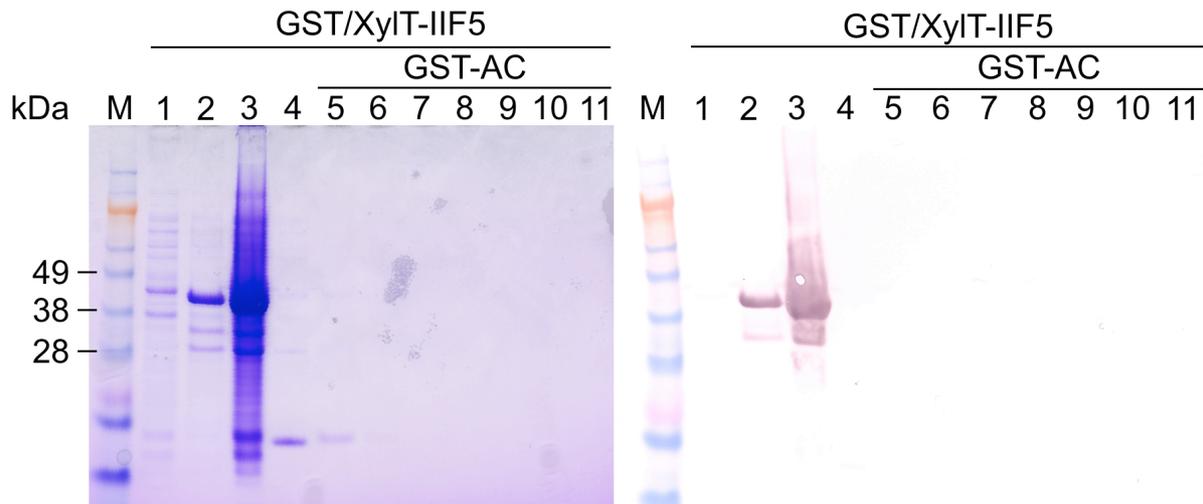


Abb. 26 Löslichkeitsbestimmung des GST/XylT-II-Fragmentes 5. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich auf verschiedenen Stufen der Aufreinigung befindliches GST/XylT-IIF5. M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 4 h IPTG-Postinduktion; 3: solubilisiertes Proteinpellet (in 8 M Harnstoff); 4: löslicher Proteinüberstand; 5: ungebundenes Protein; 6: 1. Waschschrift (Puffer I); 7: 2. Waschschrift (Puffer I); 8: 3. Waschschrift (Puffer I); 9: Elution 1 (Puffer II); 10: Elution 2 (Puffer II); 11: Elution 3 (0,5 % SDS). Rechtes Bild: Immunologischer Nachweis von GST/XylT-IIF5. GST-markiertes XylT-II wurde durch Inkubation mit einem murinen monoklonalen Antikörper, welcher gegen das GST-Epitop gerichtet war, detektiert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und die immunologische Detektion von GST/XylT-IIF5 zeigt deutlich, dass das Fusionsprotein als unlösliches Protein gebildet wird, da es nur in der solubilisierten Proteinfraction zu finden ist.

4.5.3 GST-Detektion durch enzymatischen CDNB-Aktivitätstest

GST bzw. GST-Fusionsproteine können durch einen Aktivitätstest nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer immunologischen Detektion, reagiert ein Aktivitätstest nur auf funktionelles und nicht auf inaktives GST Protein. Die GST-vermittelte Reaktion von 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion produziert ein Konjugat (CDNB-GSH), welches durch dessen Absorption bei 340 nm gemessen werden kann [96, 97]. Die zeitliche Absorptionsänderung kann dazu verwendet werden, um den relativen Anteil an GST bzw. GST-Fusionsprotein in den gemessenen Proben zu vergleichen. Dieser Sachverhalt wurde exemplarisch für GST und GST/XylT-IIF5 ermittelt. Dazu wurden Komplettlysate von GST und GST/XylT-IIF5 hergestellt, die löslichen Proteinüberstände und das mit 0,5 % Tween 20, 1 mM EDTA solubilisierte Proteinpellet von GST/XylT-IIF5 für die Aktivitätsmessungen eingesetzt (Abb. 27).

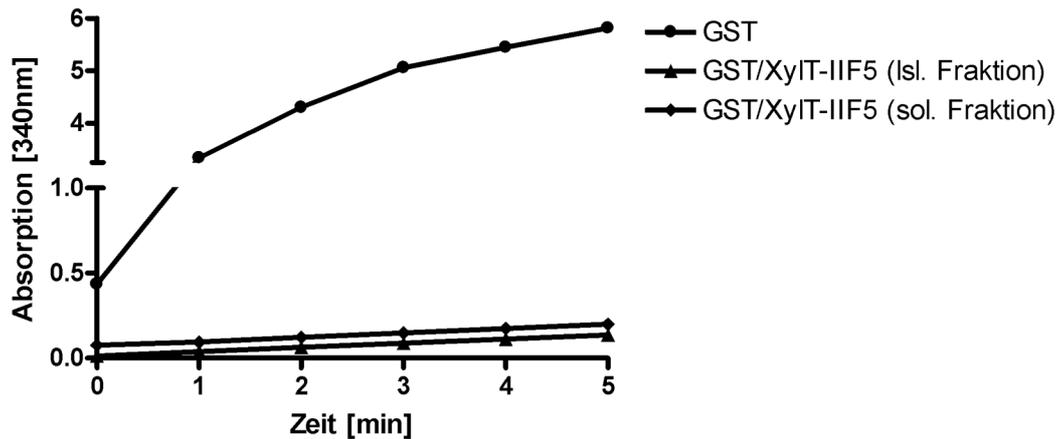


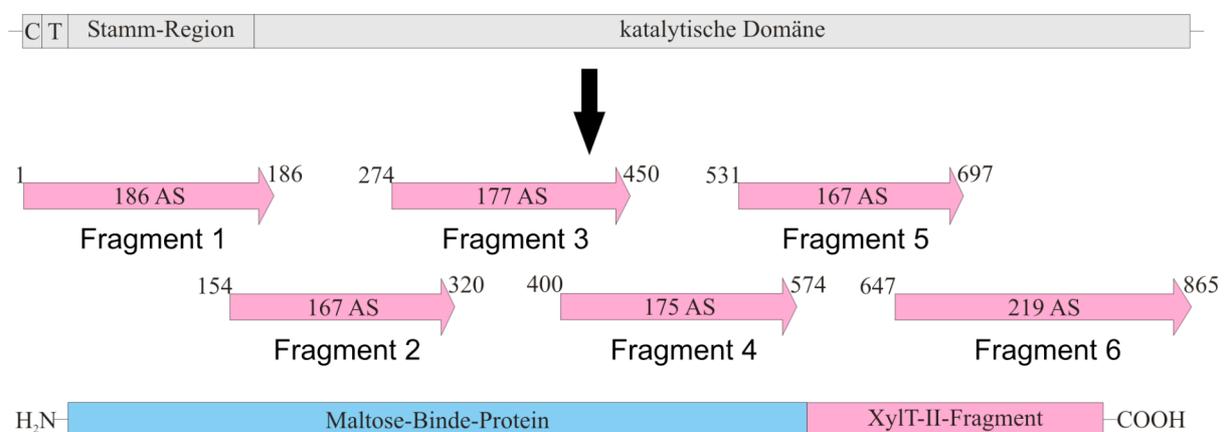
Abb. 27 Durchgeführter CDNB-Test für GST und GST/XylT-IIIF5. Dargestellt ist die zeitliche Absorptionsänderung bei 340 nm, die durch das gebildete CDNB-GSH verursacht wird.

Die erhaltenen Aktivitäten zeigen deutlich einen durch GST-verursachten Transfer von Glutathion zu CDNB, allerdings konnte für das Fusionsprotein GST/XylT-IIIF5 sowohl für den löslichen Proteinpart als auch für das solubilisierte Protein keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen, dass die GST/XylT-II-Fusionsproteine zwar in ausreichenden Mengen produziert werden, aber sie sind aufgrund der fehlenden Tertiärstruktur nicht aktiv und damit auch nicht isolierbar.

4.6 Analyse der Heparin-Bindestelle der XylT-II durch Produktion von löslichen MBP-Fusionsproteinen

4.6.1 Klonierung, Expression und Reinigung von XylT-II-Fragmenten als MBP-Fusionsproteine

Da die Expression von GST/XylT-II-Fusionsproteinen in der Bildung unlöslicher Proteine resultierte, wurde als weiterer Affinitäts-Tag das Maltose-Binde-Protein verwendet [98, 99]. Das Maltose-Binde-Protein (MBP, MW 40 kDa) ist ein *E. coli* eigenes periplasmatisches Protein, welches im Verbund mit membranassoziierten Proteinen an der Bindung und dem aktiven Transport von Maltose durch die Zellmembran beteiligt ist. Durch Fusion von MBP an rekombinante Proteine konnte gezeigt werden, dass deren Löslichkeit erhöht wird [100]. Des weiteren dient MBP als Affinitäts-Tag für die native Reinigung durch Bindung an Amylose [101] und als Epitop für eine immunologische Detektion. Für die Klonierung von XylT-II-Fragmenten wurden die gleichen Oligonukleotidsequenzen verwendet, die bereits Anwendung bei der Herstellung der GST-Fusionsproteine fanden. Die Fragmente besitzen demnach eine Länge von ~500 bp und wurden in die *Bam*HI-Schnittstelle des Expressionsvektors pMALc4E kloniert. Am N-Terminus dieser XylT-II-Fragmente befindet sich die DNA-Sequenz, welche für MBP kodiert. Die Transkription der Fusionsproteine wurde durch IPTG induziert. Die Expression erfolgte in dem *E.coli*-Stamm BL21(DE3) und wurde stets bei Raumtemperatur durchgeführt, um den Anteil an potentiell unlöslichem Protein zu reduzieren. In Abb. 28 ist exemplarisch die Reinigung von MBP/XylT-II Fragment 3 (MBP/XylT-II-F3, MW ~61 kDa) dargestellt.



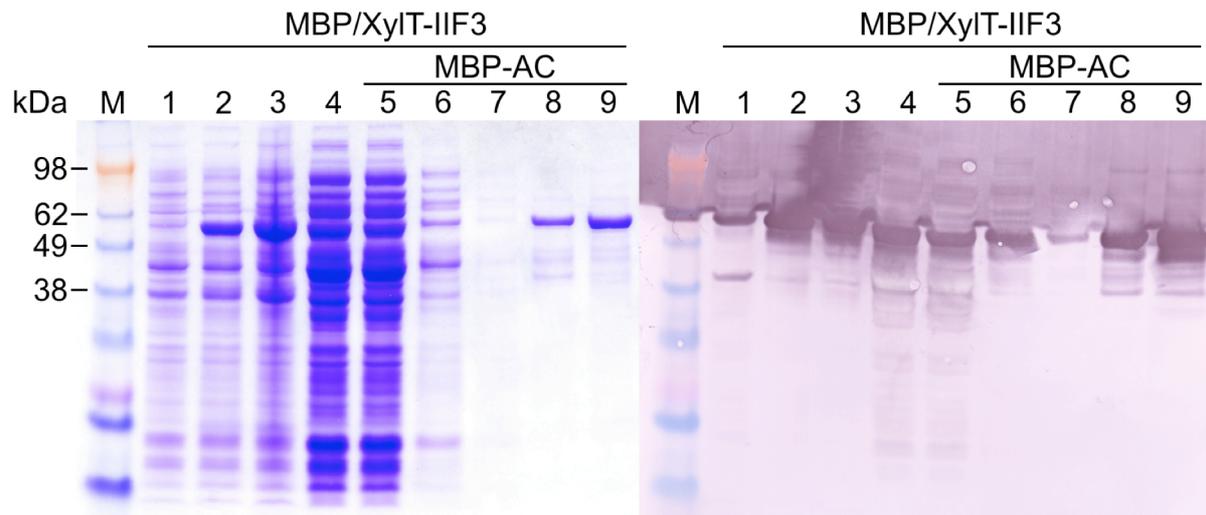


Abb. 28 Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte und Expression bzw. MBP-Reinigung von MBP/XylT-II Fragment 3. Oberes Bild: Dargestellt sind die sechs amplifizierten XylT-II-Bereiche, welche für die Klonierung in pMALc4E verwendet worden sind. Angegeben ist die Fragmentlänge in Aminosäuren (AS) und die Position der ersten und letzten Aminosäure. C: cytoplasmatische Domäne; T: Transmembran-Domäne. Unteres Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindenden MBP/XylT-II-F3 (linkes Bild). M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 2 h IPTG-Postinduktion; 3: 3 h postinduktion; 4: lösliches Protein; 5: ungebundenes Protein; 6: 1. Waschschrift; 7: 2. Waschschrift; 8: Elution 1; 9: Elution 2. MBP/XylT-II-Fusionsproteine wurden durch einen murinen monoklonalen Anti-MBP-Antikörper detektiert.

Durch Änderung des Fusionstags konnte MBP/XylT-II-F3 als lösliches Protein (MW ~61 kDa) produziert, gereinigt und durch einen monoklonalen Anti-MBP-Antikörper detektiert werden. Neben den gereinigten Fusionsproteinen, die als eine Hauptbande sichtbar waren, wurden Nebenbanden mit geringerem Molekulargewicht visualisiert. Deren Molekulargewicht lag im Bereich zwischen 38 und 62 kDa, was auf das Vorhandensein eines Proteinabbaus oder auf Translationszwischenprodukte der *XylT-II*-mRNA hindeutete. Außerdem zeigen die gelelektrophoretische Auftrennung und der immunologische Nachweis für die präinduzierte Probe (Spur 1) sowohl das endogen nachgewiesene MBP (40 kDa) als auch Protein-assoziiertes endogenes MBP (62 kDa) bzw. basal exprimiertes MBP/XylT-II-F3.

4.6.2 Heparin-Bindung von gereinigten MBP/XylT-II-Fusionsproteinen

MBP/XylT-II-Fusionsproteine wurden verwendet, um eine mögliche Heparin-Interaktion zu analysieren. Dafür wurden über Amylose gereinigte Fusionsproteine mit Heparin-*Beads* inkubiert, ungebundenes Protein durch mehrmaliges Waschen entfernt und das gebundene Protein mittels SDS-PAGE analysiert. In Abb. 29 ist exemplarisch das Ergebnis dieser Bindung für MBP/XylT-II-F3 dargestellt.

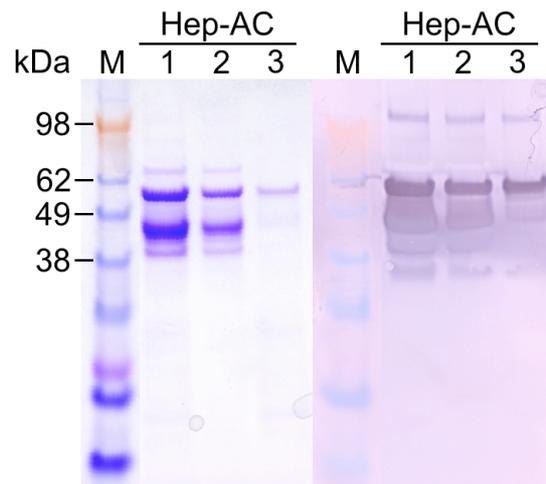


Abb. 29 Heparin-Bindung von gereinigtem MBP/XylT-II-F3. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindendem MBP/XylT-II-F3. M: Marker; 1: Ausgangsprodukt bzw. Präinkubation mit Heparin; 2: ungebundenes Protein; 3: Elution. Rechtes Bild: MBP/XylT-II-Fusionsproteine wurden durch einen murinen monoklonalen Anti-MBP-Antikörper detektiert.

Aus dem Versuch ist ersichtlich, dass MBP/XylT-II-F3 an Heparin bindet und gleichzeitig Proteinkontaminationen durch diese zweite Reinigungsstufe entfernt worden sind (Spur 3). Obwohl eine Bindung an Heparin beobachtet werden konnte, korrelierte die detektierte Proteinmenge nicht mit der eingesetzten Proteinmenge, was darauf zurückschließen lässt, dass es sich dabei um eine Heparin-bindende Sequenz mit geringer Affinität zu Heparin handelt. Versuche mit anderen MBP-fusionierten XylT-II-Fragmenten zeigten das gleiche Bindeverhalten.

4.6.3 Produktion von MBP/XylT-II-Fusionsproteinen im MBP-defizienten Stamm ER2507

Die Analyse der Heparin-Bindung der gereinigten MBP/XylT-II-Fusionsproteine hat gezeigt, dass zu wenig Protein an Heparin bindet, um damit eine erfolgreiche Durchführung der Heparin-*Bead*-Methode (2.5) zu bewerkstelligen. Um den Anteil an gebundenen Fusionsprotein zu erhöhen, bestand der nächste Schritt darin, die über Amylose gereinigten Nebenbanden zu identifizieren (4.6.1). Da alle bisherigen Expressionen in dem Expressionsstamm BL21(DE3) erfolgten und MBP ein *E. coli* eigenes Protein ist, wurde für weitere Bindungsanalysen der MBP-defiziente *E. coli*-Stamm ER2507 verwendet. Mit diesem Austausch sollte eine Produktion von endogenem MBP verhindert und dadurch eine erhöhte Menge an homogenem Fusionsprotein nach Reinigung über Amylose erhalten werden. Dieser Versuch wurde exemplarisch für MBP/XylT-II-F3 ausgeführt (Abb. 30).

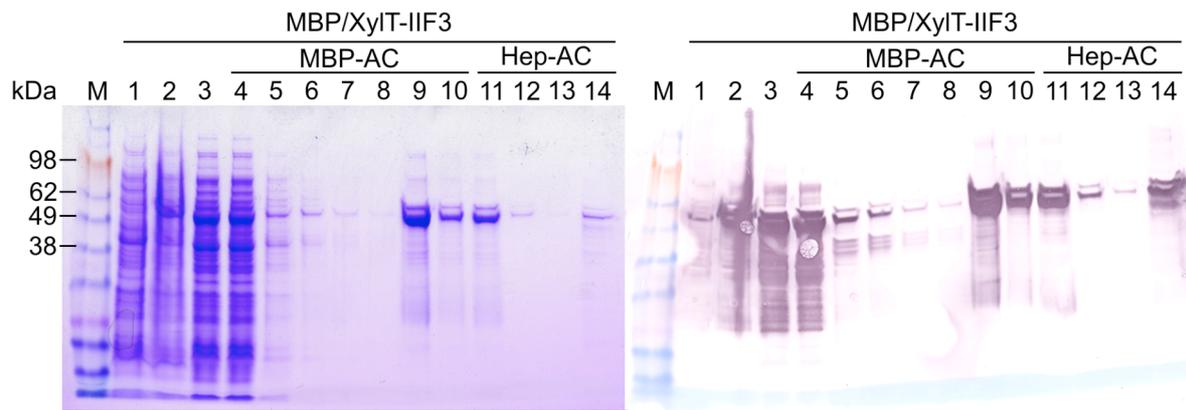


Abb. 30 Expression, MBP-Reinigung und Heparin-Bindung von MBP/XylT-II Fragment 3 in ER2507. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindenden MBP/XylT-II-F3. M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 2 h IPTG-Postinduktion; 3: lösliches Protein; 4: ungebundenes Protein; 5: 1. Waschschr.; 6: 2. Waschschr.; 7: 3. Waschschr.; 8: 4. Waschschr.; 9: Elution 1; 10: Elution 2; 11: ungebundenes Protein; 12: 1. Waschschr.; 13: 2. Waschschr.; 14: Elution 1. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylT-II-Fusionsproteine.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz Verwendung des MBP-defizienten Stamms ER2507 multiple Banden im Bereich von 49-62 kDa durch die MBP-Reinigung erhalten werden (Spur 9 und 10). Dies spricht somit für einen Proteaseabbau des Vollängen-Konstrukts MBP/XylT-II-F3 oder für Translationszwischenprodukte beim mRNA-Übergang von MBP zu XylT-II-F3. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die multiplen Banden Proteinkontaminationen repräsentieren, ist gering, da diese gleichzeitig eine Affinität für Amylose und eine Kreuzreaktivität mit dem monoklonalen Anti-MBP-Antikörper besitzen müssten. Die Heparin-Affinitätschromatographie des Fusionsproteins zeigt nur geringe Mengen an gebundenem Protein.

4.6.4 Produktion verlängerter MBP/XylT-II-Fragmente in ER2507

Aufgrund der geringen Affinität der bislang exprimierten MBP/XylT-II-Fusionsproteine wurden größere Konstrukte hergestellt, um eine Kooperativität mehrerer vorhandener Heparin-Bindemotive hervorzurufen und damit eine stärkere Bindung an Heparin zu generieren. Zu diesem Zweck wurden zwei Konstrukte erzeugt, welche die XylT-II-Fragmente 1 bis 3 (MBP/XylT-II-F1-3, MW 90 kDa) bzw. 4 bis 6 (MBP/XylT-II-F4-6, MW 92 kDa) beinhalteten. Die Expression, Reinigung und Heparin-Bindung dieser Fragmente ist in Abb. 31 illustriert.

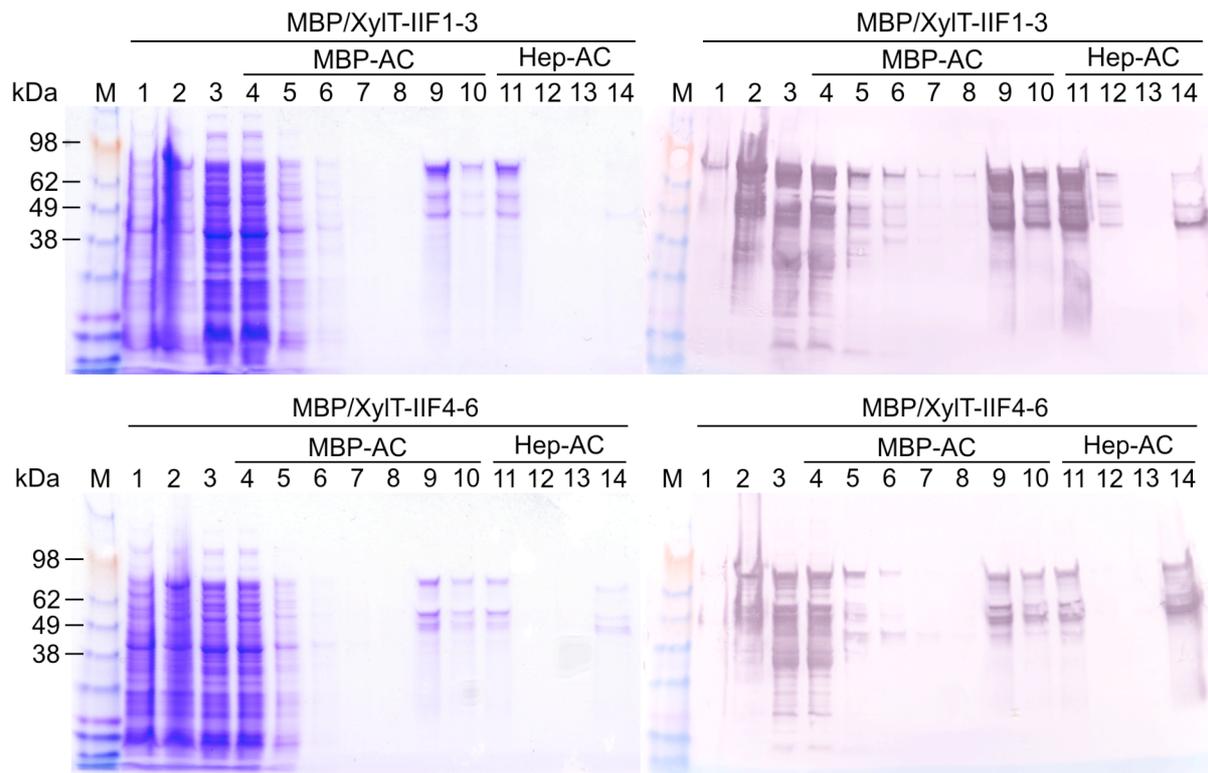


Abb. 31 Expression, MBP-Reinigung und Heparin-Bindung von verlängerten XylT-II Fragmenten in ER2507. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindenden Fusionsproteinen. M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 2 h IPTG-Postinduktion; 3: lösliches Protein; 4: ungebundenes Protein; 5: 1. Waschschrift; 6: 2. Waschschrift; 7: 3. Waschschrift; 8: 4. Waschschrift; 9: Elution 1; 10: Elution 2; 11: ungebundenes Protein; 12: 1. Waschschrift; 13: 2. Waschschrift; 14: Elution 1. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylT-II-Fusionsproteine.

Die Analyse beider Fragmente hat gezeigt, dass auch hier von der Amylose-Matrix diverse Proteinbanden im Bereich von 49 und 98 kDa zusammen mit dem eigentlichen Volllängen-Konstrukt eluieren. Zwar konnte immunologisch ein Nachweis bezüglich der Bindung an Heparin erbracht werden, jedoch war anhand der gelelektrophoretischen Auftragung auch feststellbar, dass sich die Ausbeute durch die Verlängerung der XylT-II DNA nicht vergrößert hat.

4.6.5 Expression und Reinigung von MBP/XylT-II-Fragmente in CAG629

Der *Escherichia coli*-Stamm CAG629 ist laut Literatur ein Protease-defizienter Stamm, welcher die Expression von MBP-Fusionsproteinen fördern soll. Aus diesem Grund wurden die Fusionsproteine MBP/XylT-IIF3 und MBP/XylT-IIF4-6 in diesem Stamm exprimiert und über Amylose gereinigt. Mit dieser Prozedur sollte eine Protease-vermittelte Fragmentierung des Volllängen-Konstrukts verhindert werden. Das Ergebnis dieser Expressionen ist in Abb. 32 dargestellt.

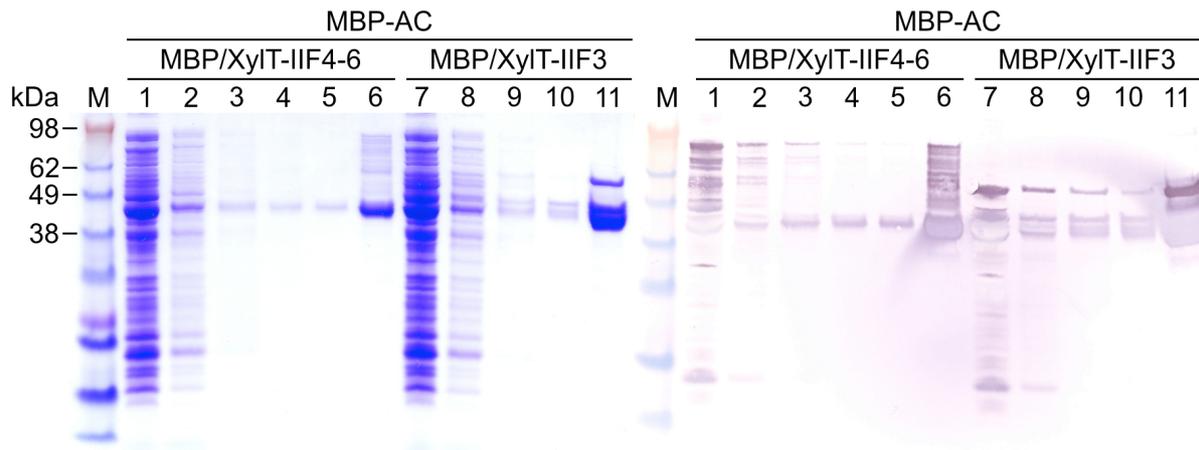


Abb. 32 Expression und MBP-Reinigung von MBP/XylT-IIF1-3 und MBP/XylT-IIF4-6 in CAG629. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindenden Fusionsproteinen. M: Marker; 1: lösliches Protein; 2: 1. Waschschrift; 3: 2. Waschschrift; 4: 3. Waschschrift; 5: 4. Waschschrift; 6: Elution 1; 7: lösliches Protein; 8: 1. Waschschrift; 9: 2. Waschschrift; 10: 4. Waschschrift; 11: Elution 1. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylT-II-Fusionsproteine.

Die in CAG629 erfolgten Expressionen haben ergeben, dass trotz Benutzung eines Protease-defizienten Stammes multiple Banden nach der Reinigung der Fusionsproteine erhalten worden sind, wobei das ~40 kDa große MBP das Hauptprodukt ausmachte.

4.6.6 Ligandenschutztest durch Inkubation mit Heparin

Um die Proteinstabilität eines rekombinanten Proteins zu erhöhen, bedient man sich u. a. der Möglichkeit, das heterolog exprimierte Protein durch Koexpression oder Inkubation mit einem natürlichen Liganden zu schützen. Da bereits nachgewiesen worden ist, dass XylT-II mit Heparin interagiert, wurde Heparin sowohl während der Expression von MBP/XylT-IIF1-3 und MBP/XylT-IIF4-6 dem Medium als auch während der Reinigung zugegeben. In Abb. 33 ist exemplarisch das Ergebnis für MBP/XylT-IIF4-6 dargestellt.

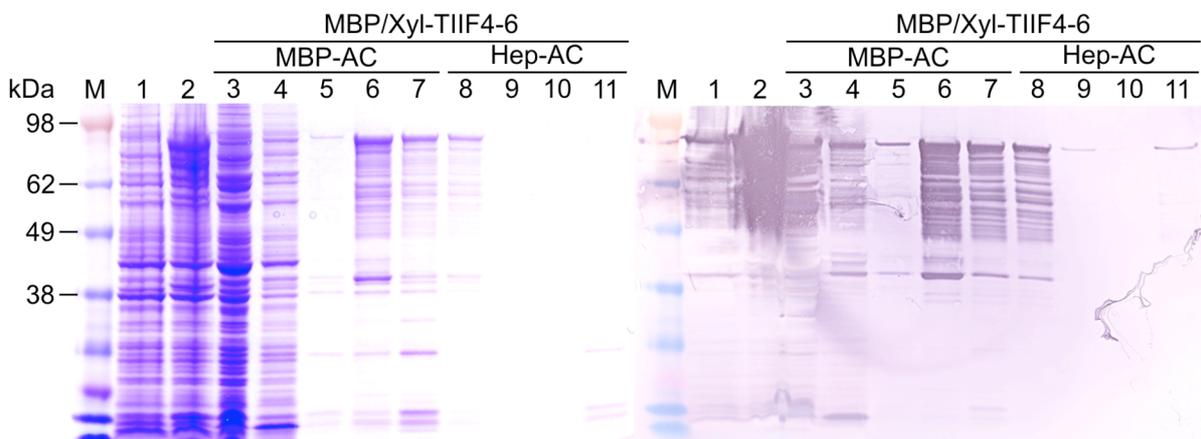


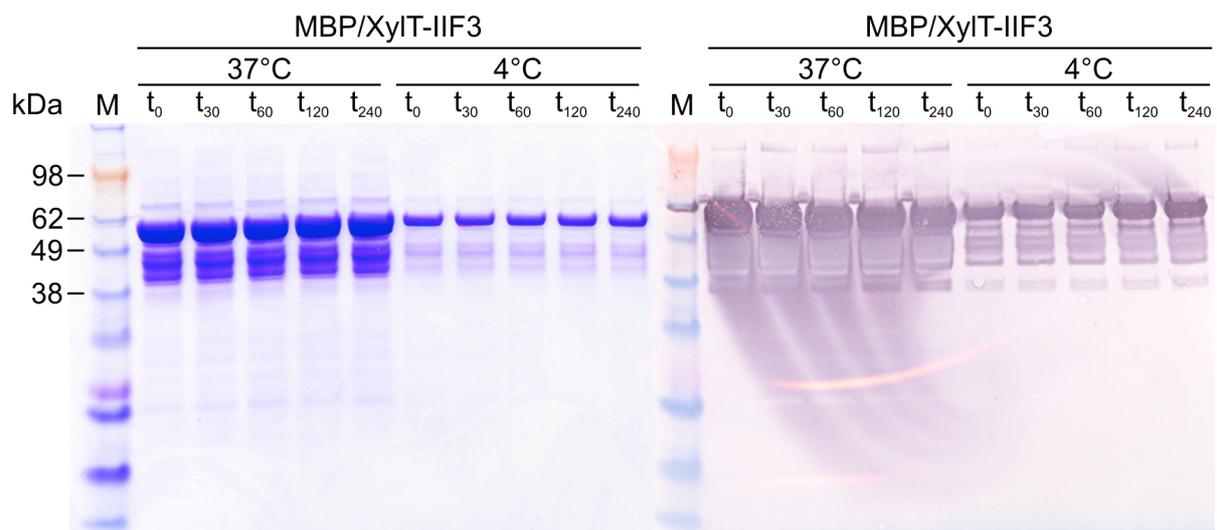
Abb. 33 Expression, MBP-Reinigung und Heparin-Bindung von MBP/XylT-IIF4-6 in Gegenwart von Heparin. Linkes Bild: Gelelektrophoretische Auftrennung von sich in verschiedenen Phasen der Aufreinigung befindenden Fusionsproteinen. M: Marker; 1: Präinduktion; 2: 2 h IPTG-Postinduktion; 3: ungebundenes Protein;

4: 1. Waschschrift; 5: 4. Waschschrift; 6: Elution 1; 7: Elution 2; 8: ungebundenes Protein; 9: 1. Waschschrift; 10: 2. Waschschrift; 11: Elution 1. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylIT-II-Fusionsproteine.

Die Gegenwart von Heparin während der Produktion und Reinigung von MBP/XylIT-IIF4-6 hat zu keiner Reduktion der über Amylose gereinigten Nebenbanden geführt (Spur 6 und 7). Dieses Ergebnis wurde ebenso für MBP/XylIT-IIF1-3 erhalten. Außerdem zeigt die Heparin-Affinitätschromatographie, dass zwar immunologisch eine Heparin-Bindung von MBP/XylIT-IIF4-6 erhalten worden ist (Spur 11), jedoch konnte dies nicht im SDS-PAGE visualisiert werden.

4.6.7 Bestimmung der Proteinstabilität durch Inkubationsstudien

Ein Verfahren der möglichen Identifizierung eines durch Protease-vermittelten Proteinabbaus ist die Inkubation einer gereinigten Proteinprobe bei verschiedenen Temperaturen, eine Probenentnahme zu definierten Zeitpunkten und eine Analyse des Bandenmusters durch SDS-PAGE. Im Falle eines vorhandenen Proteinzerfalls würden im Laufe der Inkubationszeit Banden mit geringerem Molekulargewicht entstehen, während gleichzeitig die Proteinkonzentration des Volllängen-Konstrukts und damit dessen Bandenintensität abnimmt. Dieser Versuch wurde sowohl für MBP/XylIT-IIF3 als auch für MBP/XylIT-IIF4-6 durchgeführt, wobei Proben sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C inkubiert worden sind (Abb. 34).



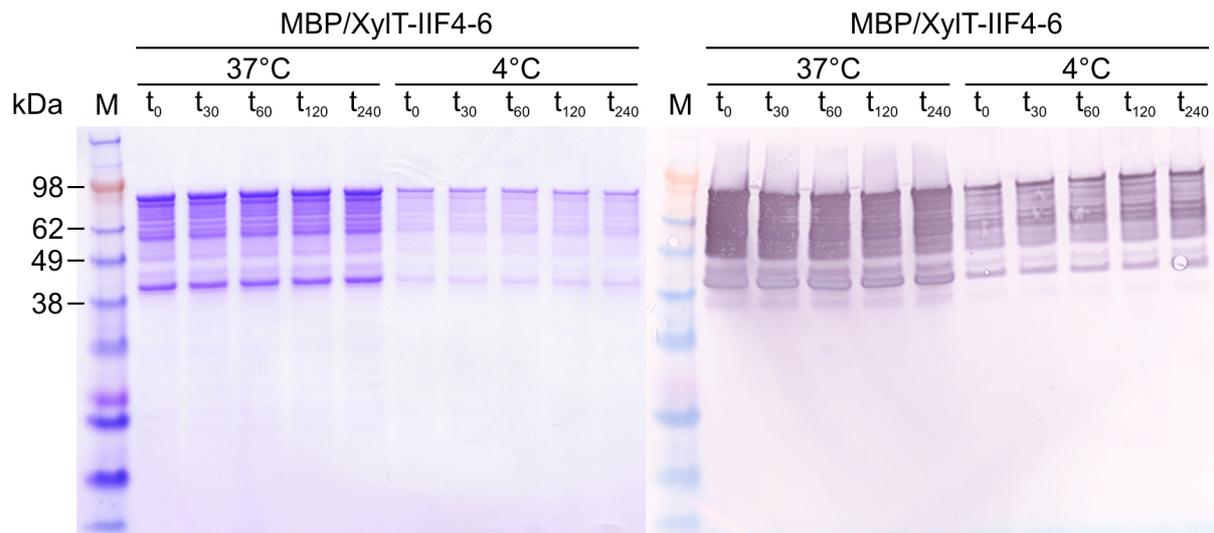


Abb. 34 Darstellung eines möglichen Proteinzerfalls durch Inkubationsstudien. Linkes Bild: Über MBP-gereinigte Fusionsproteine wurden bei 37 °C und 4 °C gelagert und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE analysiert. M: Marker. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylT-II-Fusionsproteine.

Verglichen mit der gereinigten Ausgangsprobe (t_0) hat die Inkubation der Proben weder bei 4 °C noch bei 37 °C eine Änderung des Bandenmusters (t_{30} - t_{240}) hervorgerufen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Fusionsproteine stabil sind und die zusätzlichen Banden nach der Reinigung keinen Proteinzerfall darstellen.

4.6.8 Expression von MBP/XylT-II Fusionsproteinen in Rosetta 2(DE3)

Die bisherigen Experimente bezüglich der Identifikation der von der Amylose-Matrix eluierten Nebenbanden haben keinen Hinweis auf einen vermeintlichen Proteinabbau ergeben. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die detektierten Nebenbanden ausschließlich Translationszwischenprodukte darstellen, die aus dem unterschiedlichen Codon-Gebrauch von *E. coli* resultieren. Um diese Theorie zu bestätigen, wurden Expressionen von MBP/XylT-IIF3 und MBP/XylT-IIF4-6 in dem Stamm Rosetta 2(DE3) durchgeführt. Dieser Stamm besitzt das Plasmid pRARE2, welches für tRNAs mit sieben selten verwendeten Codons (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA und CGG) kodiert. Nach der Reinigung wurde die Proteininstabilität durch Inkubationsstudien bei 37 °C bestimmt, um gleichzeitig Veränderungen des Bandenmusters zu erkennen, die auf eine endogene Proteaseaktivität hinweisen (Abb. 35).

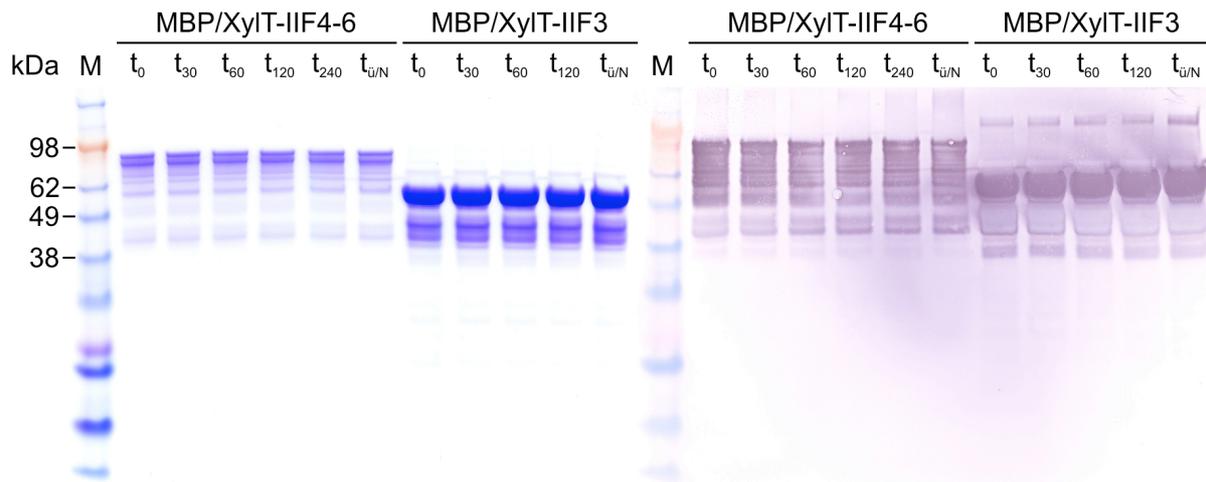


Abb. 35 Darstellung eines möglichen Proteinzerfalls durch Inkubationsstudien. Linkes Bild: Über Amylose-gereinigte Fusionsproteine wurden bei 37 °C gelagert und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE analysiert. M: Marker. Rechtes Bild: Immunologische Detektion der MBP/XylT-II-Fusionsproteine.

Der Vergleich mit Abb. 34 zeigt, dass die Expression von MBP/XylT-IIF3 und MBP/XylT-IIF4-6 in dem Stamm Rosetta 2(DE3) zu einer Verringerung der Translationszwischenprodukte geführt hat (Spur t₀ für MBP/XylT-IIF4-6). Dieser Effekt ist für das Konstrukt MBP/XylT-IIF4-6 ausgeprägter als für MBP/XylT-IIF3, was auf dem Vorhandensein einer längeren humanen *XylT-II* DNA beruht. Die Expression von MBP/XylT-IIF4-6 hat zu einer Verringerung von Banden im Bereich von 38 bis 98 kDa geführt und gleichzeitig zu einer Anreicherung von zwei deutlich ausgeprägten hochmolekularen Proteinbanden, wobei die oberste Bande wahrscheinlich das MBP/XylT-IIF4-6 Volllängenkonstrukt darstellt. Des weiteren impliziert die zeitliche Analyse keinen Proteaseabbau, da keine niedermolekularen Proteinfragmente entstehen. So bestätigt sich die Vermutung, dass es aufgrund eines für *E. coli* nicht optimierten Codon-Gebrauchs zu keiner homogenen Isolierung von MBP/XylT-II Fusionsproteinen kommt.

5 Diskussion

5.1 Biochemische Charakterisierung der Xylosyltransferase II

Die Xylosyltransferase II (XylT-II) ist ein XylT-I paraloges Protein, dessen enzymatische Aktivität erst vor kurzem entdeckt worden ist [54-56]. Das XylT-II Protein ist wie XylT-I fähig, die posttranslationale Biosynthese von Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Ketten an das *Core*-zu initiieren. Beide Proteine bewerkstelligen den Xylosetransfer von UDP-Xylose zu spezifischen Serin-Aminosäuren des *Core*-Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte XylT-II durch heterologe Expression in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* produziert und biochemisch charakterisiert werden. Der Vorteil in der Verwendung dieses Organismus war zum einen die Tatsache, dass *P. pastoris* keine endogenen Xylosyltransferasen besitzt und zum anderen sollte ein Expressionssystem für diese Proteine etabliert werden, welches praktikabler für *Downstream*-Prozesse ist, wie z. B. die Herstellung von Proteinkristallen für die Strukturbestimmung.

Die XylT-I und XylT-II stellen natürlich vorkommende sekretorische Proteine dar, denen im prozessierten Zustand die cytoplasmatische und Transmembran-Domäne fehlen. Zu diesem Zweck wurde für die Konstruktion der Expressionsvektoren ausschließlich die Stamm-Region und katalytische Domäne der XylT-II verwendet. XylT-II konnte dabei erfolgreich funktionell in *P. pastoris* produziert werden, wobei die gemessene Aktivität abhängig vom verwendeten Stamm als auch von den Kultivierungsbedingungen war. Eine endogene Aktivität des Organismus war nicht zu detektieren. Es konnte eine Anreicherung der XylT-II im Kulturüberstand beobachtet werden, was die Benutzung eines Fermenters für eine längerfristige, kontinuierliche und gesteigerte Produktausbeute, favorisiert.

Für die XylT-II wurde die Substratspezifität für diverse potentielle Akzeptoren getestet von denen bekannt war, dass sie XylT-I Akzeptoren sind. Zusätzlich wurden Akzeptoren untersucht, die entweder das G-S-G XylT-I Erkennungsmotiv besaßen oder die ein in einer sauren Umgebung eingebettetes Serin beinhalteten. Dabei konnte ermittelt werden, dass die gemessenen K_M -Wert für XylT-II aus *Pichia* mit denen übereinstimmen, die aus einer mit XylT-II transfizierten Xylosyltransferase-defizienten Zelllinie erhalten worden sind [54]. Dadurch konnte ein negativer Einfluss des Expressionssystem auf die biochemische Charakterisierung von XylT-II ausgeschlossen werden. Verglichen mit XylT-I wurde für XylT-II eine ähnliche Akzeptorpräferenz ermittelt (Bikunin-Peptid > Bikunin > FGF2[1-24] >

Seidenfibroin). Interessanterweise konnte für XylT-II keine Aktivität beobachtet werden, falls L-APP oder L-APLP2 als Akzeptoren verwendet worden sind. Diese Akzeptoren stellen hingegen gute Akzeptoren für XylT-I (K_M L-APP: 20,1 μ M, K_M L-APLP2: 18,9 μ M) dar [102]. Beides sind Proteine, die in der pathologischen Entwicklung von Alzheimer beteiligt sind. Da die mRNA-Expression beider Xylosyltransferase in Hirngewebe annähernd gleich ist, impliziert dieses Ergebnis eine unterschiedliche Rolle beider Proteine in der Ausbildung dieser Krankheit. Die Ähnlichkeit beider Xylosyltransferase hinsichtlich ihrer Akzeptorpräferenz lässt vermuten, dass ihre physiologische Rolle nicht primär auf ihre Akzeptorspezifität sondern wahrscheinlich auf ihrer Affinität beruht.

In Säugetieren existieren zwei Xylosyltransferasen mit gleicher enzymatischen Aktivität. Es sind allerdings diverse Beispiele für einzelne Proteine vorhanden, die eine zweite katalytische Domäne beherbergen. Dies trifft z. B. auf die Heparansulfat-N-Deacetylasen/N-Sulfotransferasen (NDST) [103, 104] oder auf die Ko-Polymerasen EXT1/EXT2 zu, die eine N-Acetylglucosamin- und Glukuronsäure-Transferaseaktivität besitzt [105, 106]. Deswegen wurde eine mögliche vorhandene Bifunktionalität von XylT-II hinsichtlich der verwendeten UDP-Zucker untersucht. Unter Verwendung zweier unterschiedlicher Akzeptoren zeigt sich jedoch, dass XylT-II bis dato ein monofunktionelles Enzym zu sein scheint.

Des Weiteren wurde die Ionenabhängigkeit der XylT-II bestimmt. Die Notwendigkeit für bivalente Ionen als Kofaktoren stellt ein Charakteristikum von eukaryontischen Glykosyltransferasen dar. Für XylT-II haben Voglmeier et al. [55] postuliert, dass dieses Enzym keine bivalenten Kationen für dessen Aktivität benötigt. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass das Fehlen solcher Ionen zu keinem Xylosetransfer auf Akzeptoren führt und dass für eine detektierbare Aktivität Mg^{2+} -, Mn^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen vorhanden sein müssen. Diese Ionen konnten nicht durch Ni^{2+} -, Co^{2+} -, Zn^{2+} - oder Cu^{2+} -Ionen ersetzt werden. Bezüglich dem Ergebnis von Voglmeier et al. kann nur spekuliert werden, dass durch die Verwendung eines Zellkulturlysats genügend bivalente Ionen verfügbar waren, um einen Xylosetransfer zu erreichen. Im Gegensatz dazu wurden die hier durchgeführten Messungen stets mit entsalzten XylT-II Proben durchgeführt.

Für die XylT-II konnte ein Temperaturoptimum von 30 °C ermittelt werden. Dieser Umstand überrascht, da humane Enzyme ihre optimale Aktivität in der Nähe der Umgebungstemperatur von 37 °C besitzen. Obwohl dies hier nicht der Fall gewesen ist, existieren Beispiele von Enzymen deren optimale Aktivität nicht mit der Umgebungstemperatur korreliert. So ist über Serin-Hydroxymethyltransferase, aus der Leber von Affen stammend bekannt, dass dieses ein Temperaturoptimum von 60 °C besitzt [107]. Dieser Effekt wird durch dessen Bindung von

L-Serin hervorgerufen, was die Beobachtung verstärkt, dass Substrate oder Effektoren oft die Stabilität der Proteine beeinflusst und in einer Änderung deren Temperaturprofils resultiert. Es liegt die Vermutung nahe, dass das *Pichia* Expressionssystem nicht solche interagierenden Proteine enthält, welche für die Modulation des Temperaturprofils von XylT-II verantwortlich sind.

Außerdem wurde der Effekt von Nukleotid-Derivaten auf die Aktivität der XylT-II analysiert. Hier ergaben die Untersuchungen, dass XylT-II effektiv durch UDP inhibiert wird. Zwei Phosphat-Gruppen waren optimal, um bereits bei geringer Konzentration eine Inhibition zu erreichen, da UMP und UTP keine entsprechende Wirkung besaßen. Ein Austausch der Uridin-Base zu Cytidin schien weit weniger gravierend zu sein, da CDP im Gegensatz zu UDP bei mittlerer Konzentration noch annähernd keinen Einfluss auf XylT-II hatte. Die Aktivität der XylT-II konnte weder durch Ribose noch durch eine Base alleine blockiert werden. Das impliziert, dass diese Nukleotid-Bestandteile beim Bindeprozesse der XylT-II nicht involviert sind.

Der Einfluss von exogenen Proteinen auf die Aktivität von XylT-II wurde ebenfalls untersucht. Es war bekannt, dass die Zugabe von basischen Proteine und Polyamine die Aktivität von Xylosyltransferase, Chondroitin-6-Sulfotransferase und Heparansulfat-6-Sulfotransferase erhöhen [53, 93, 108, 109]. Hier konnte gezeigt werden, dass XylT-II positiv durch Histone und Protamine beeinflusst wird aber nicht durch Lysozym. Obwohl alle Proteine basische Proteine darstellen, scheint die positive Nettoladung nicht das alleinige Kriterium für die veränderte XylT-II-Aktivität zu sein. Die Aktivierung der XylT-II durch Histone und Protamine kann durch Verringerung des K_M -Wertes des Akzeptors erklärt werden. Es wurde vermutet, dass die basischen Proteine XylT-II nicht direkt beeinflussen, sondern durch die Bildung eines Akzeptor/Effektor-Komplexes, ein favorisiertes Substrat für XylT-II generiert wird.

5.2 Anreicherung und Isolierung der Xylosyltransferase II

Für die meisten biochemischen Methoden sind Proteine in genügender Menge und hoher Reinheit zu besitzen, eine notwendige Voraussetzung. Für die Anwendung als Antigen für die Antikörper-Produktion, für eine N-Terminale Sequenzierung, für die therapeutische Benutzung, für die Strukturbestimmung und für viele physico-chemischen Charakterisierungsmethoden sind ausschließlich nur isolierte Proteine brauchbar.

Bislang existieren keine Reinigungsprotokolle für die Isolierung von Xylosyltransferasen, die heterolog in *Pichia pastoris* produziert worden sind. Aus diesem Grund sollte ein Reinigungsprotokoll etabliert werden, der zu einer Anreicherung bzw. Isolierung der XylT-II führen sollte.

Die Xylosyltransferasen können bis heute zuverlässig nur durch ihre Enzymaktivität detektiert werden, so dass alle Isolierungs- und Reinigungsschritte für das Enzym nur native Methoden eingesetzt werden konnten. Als Ausgangsmaterial dienten hierfür 40 Liter XylT-II-Kulturüberstand, der durch Anwendung von Konzentratoren auf 1215 ml eingeengt wurde. Als Medium wurde Vollmedium verwendet, da die Benutzung von Minimalmedium zu keiner detektierbaren XylT-II-Aktivität führte.

Eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung wurde als geeignet angesehen, um XylT-II aus dem Medium zu Extrahieren und gleichzeitig zu Konzentrieren. Dabei konnte eine 4fache Proteinreinigung bei einem XylT-II-Verlust von 11 % ermittelt werden.

Da bereits beobachtet worden ist, dass XylT-II eine hohe Affinität hinsichtlich Heparin besitzt, wurde eine Heparin-Affinitätschromatographie als erster chromatographischer Schritt verwendet. Verglichen zur vorherigen Ammoniumsulfat-Fällung, wurde hierbei der größte Reinigungsfaktor erreicht bei einer gleichzeitigen Ausbeute von 40 %.

Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens wurde eine Anionenaustauschchromatographie als zweite Reinigungsstufe verwendet. Dabei konnte XylT-II effektiv 13fach zum vorherigen Reinigungsschritt gereinigt werden und eine Restausbeute von 3 % erhalten werden. Aufgrund der limitierten Menge konnten keine weiteren Reinigungsschritte etabliert werden.

Mittels SDS-PAGE wurde die Reinheit ausgewählter Proben analysiert. Dabei konnte eine Bande, welche mit der gemessenen XylT-II-Aktivität korrelierte massenspektrometrisch untersucht werden und fünf Peptide der XylT-II zugeordnet werden.

5.3 Analyse der Heparin-Bindestelle von XylT-II aus *E. coli*

Die Interaktion von Glykosaminoglykanen mit Proteinen beeinflusst deren physiologische Aktivität durch Lokalisation, Stabilisierung, Aktivierung oder Inaktivierung [63, 110, 111]. Die Xylosyltransferasen I und II binden ebenfalls mit hoher Affinität an Heparin, wodurch ihre Transferaseaktivität blockiert wird. Als weiteres Projekt sollte deswegen die vorhandene Heparin-Bindestelle der Xylosyltransferase II durch die Anwendung einer von Vivès et al. publizierten Methode identifiziert werden [83]. Das Prinzip dieser Methode basiert auf das Immobilisieren einer gereinigter XylT-Lösung an eine Heparin-Matrix, dem Quervernetzen der Heparin-bindenden Domäne des Proteins mit Heparin, einem proteolytischen Verdau nicht-interagierender Bereiche und die Identifikation des Heparin-Bindemotivs durch Edman-Abbau.

Da die Gegenwart von zusätzlichen Heparin-bindenden Proteine die Identifizierung eines Heparin-Bindemotivs erschwert, war die Herstellung einer gereinigten homogenen XylT-II Lösung unabdingbare Voraussetzung. Zu diesem Zweck wurde für die Herstellung der Organismus *Escherichia coli* als Expressionssystem aufgrund zweier Faktoren ausgewählt. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die Expression der Xylosyltransferasen in allen bisherigen Systemen sehr aufwendig ist. Zwar ist es sehr gut möglich die Aktivitäten nachzuweisen, allerdings gestaltet sich deren Visualisierung mittels SDS-PAGE, aufgrund der sehr geringen Konzentrationen, als schwierig. Zum anderen scheinen Xylosyltransferasen unabhängig von der Tertiärstruktur an Heparin zu binden [112]. Deswegen bot sich *E. coli* als Organismus an, da hohe Ausbeuten ohne die Notwendigkeit der richtigen Strukturbildung für eine Heparin-Bindung, kombiniert werden konnte.

Es wurden zwei Strategien der Reinigung verfolgt. Die erste Strategie beinhaltete die gezielte Produktion von XylT-II als unlösliche *Inclusion bodies* (IB). Der Vorteil darin bestand in der Stabilität, Reinheit, Ausbeute und in der Möglichkeit, XylT-II als Vollängen-Konstrukt zu produzieren. Damit sollte eine mögliche Disruption eines Heparin-Bindemotivs verhindert werden. Diese Strategie hat in soweit funktioniert als das es gelungen ist, eine homogene gereinigte XylT-II-Lösung zu erhalten. Die Solubilisierung der IB erfolgte dabei durch Einsatz eines denaturierenden Agenz. Für die Anwendung der Heparin-*Bead*-Methode war es allerdings notwendig, das solubilierte Protein in einen für eine Heparin-Bindung geeigneten Puffer zu überführen. Die Dialyse der Proben in kompatible Puffer resultierte in die

Präzipitation von XylT-II, sobald der Harnstoff entzogen worden ist. Die Möglichkeit, das denaturierende Agens durch Verdünnung zu entfernen, war nicht praktikabel.

Die zweite Strategie beinhaltete die Klonierung von XylT-II-Fragmenten, deren Expression als Fusionsprotein mit einem Affinitäts-*Tag* und eine entsprechende native Reinigung. Als Fusionsprotein wurde zu Beginn die Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet, da es die Löslichkeit rekombinanter Proteine erhöhen soll und ein hohes Molekulargewicht (MW 26 kDa) besitzt. Die Analyse der Expressionsstudien hat jedoch gezeigt, dass zwar für alle hergestellten Fusionsproteine ein solches Expressionsniveau erreicht worden ist, allerdings konnten sie nicht über eine Glutathion-Matrix gereinigt werden. Ursache dafür war deren Produktion als unlösliche Proteinaggregate, der durch einen Löslichkeitstest und einem enzymatischen Aktivitätstest von funktionellem GST nachgewiesen worden ist. Ohne funktionelles GST würde die Affinitätsreinigung nicht zum Erfolg führen, weil sie von der richtigen Faltung des GST abhängig ist.

Da die Produktion von GST/XylT-II-Fusionsproteinen nicht erfolgreich gewesen ist, wurde in einem weiteren Ansatz der GST-Fusionstag durch das Maltose-Binde-Protein (MBP) ersetzt. Dieses Protein besitzt hinsichtlich dem Molekulargewicht und dessen Verwendung als Löslichkeits-*Tag* ähnliche Eigenschaften wie GST. Es konnten MBP/XylT-II-Fusionsproteine als lösliche Proteine exprimiert und über Amyloseharz gereinigt werden. Dabei zeigten sich jedoch multiple Banden, die alle ein Molekulargewicht besaßen, die zwischen dem von MBP und dem Volllängen-Konstrukt lagen. Zusätzlich sind diese multiplen Banden immunologisch erkannt worden. Obwohl keine reine Lösung erhalten worden ist, war es möglich diese Proteinlösung für eine Heparin-Bindung zu verwenden. Bei der Heparin-Bindung der Fusionsproteine hat sich gezeigt, dass die Menge an gebundenem Protein nicht mit der eingesetzten Menge korrelierte, um die Heparin-*Bead*-Methode erfolgreich anzuwenden.

Um den Anteil an Heparin-gebundenem Volllängenprotein zu erhöhen, war es notwendig die multiplen Banden aus der ersten Reinigungsstufe zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene Strategien entwickelt. Zum einen wurde ein MBP-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, der bezüglich endogenem MBP deletiert gewesen ist. Dadurch sollte eine Koreinigung verhindert werden und der Anteil an gebundenem MBP-Fusionsprotein erhöht werden. Zum anderen wurden Fusionsproteine hergestellt, die ein deutlich verlängertes XylT-II-Fragment beinhalteten, da eine kooperative Bindung durch mehrere Heparin-Bindestellen und damit eine verstärkte Heparin-Bindung vermutet worden ist [82]. Die Expression in einem Protease-defizienten Stamm sollte Rückschlüsse zulassen, ob die multiplen Banden aus der ersten Reinigungsstufe aus einer proteolytischen Aktivität herrühren [113]. Die Bestimmung der

Proteinstabilität durch Inkubationsstudien sollte einen vorhandenen Proteinzerfall oder einen proteolytischen Prozess aufzeigen [114]. Der Zusatz eines Liganden während der Expression und der Reinigung sollte zur Stabilität des Volllängen-Konstrukts beitragen [115]. Die Expression der Fusionsproteine in Rosetta 2(DE3) hat schließlich Hinweise geliefert, dass die multiplen Banden Translationszwischenprodukte der XylT-II darstellen, welche aufgrund eines nicht für *E. coli* optimierten Codon-Gebrauch herrühren [116].

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Expressionssystem für Xylosyltransferasen etabliert, das aufgrund fehlender endogener Xylosyltransferase-Aktivität in *P. pastoris* geeignet ist, diese Proteine biochemisch zu charakterisieren. Zusätzlich ist dieses System besonders gut geeignet, die Produktausbeute durch einen Fermenter *Scale-Up* zu erhöhen, da die Möglichkeit gegeben ist, extrem hohe Zelldichten von *P. pastoris* durch fermentative Wachstumsbedingungen zu erzielen.

Des Weiteren wurde ein Reinigungsprotokoll für XylT-II entwickelt, die zu einer Anreicherung und Teilreinigung geführt hat. In Kombination mit fermentativen Wachstumsbedingungen kann zukünftig eine ausreichende Menge an Ausgangsprotein hergestellt werden, die es erlaubt, das Reinigungsprotokoll für kristallographische Untersuchungen zu vervollständigen.

Pichia pastoris erlaubt es auch, beide Xylosyltransferase hinsichtlich einer möglich vorhandenen zweiten Enzymaktivität zu untersuchen. Am Beispiel der Glykosyltransferasen EXT1 und EXT2 konnte dies bereits gezeigt werden. Beide Proteine bilden einen heterodimeren Komplex im Golgi-Apparat, der als Ko-Polymerase für Heparansulfat-Ketten fungiert. Es besteht die Möglichkeit, dass beide Xylosyltransferase-Isoenzyme eine noch unbekannte Nebenaktivität beherbergen. Das etablierte Expressionssystem eignet sich hervorragend, beide Proteine separat als auch in Form einer XylT-I/XylT-II-Koexpression zu produzieren und anschließend die Aktivitäten als auch das (doppelte) Molekulargewicht mittels Größenausschlusschromatographie zu analysieren.

In einem weiteren Bereich dieser Arbeit wurde versucht, die Heparin-Bindestelle von XylT-II durch Produktion dieses Proteins als Volllängen-Konstrukt als auch in Form von kleinen Fragmenten in *E. coli* zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass die Produktion eines humanen Proteins in diesem prokaryontischen System mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, um

daraus erfolgreich eine hohe Menge an konzentriertem und gereinigtem Protein zu erhalten. Zusätzlich besteht hier die Vermutung, dass die hohe Affinität von XylT-II zu Heparin ausschließlich in dessen nativen Zustand vorhanden ist, so dass eine Analyse der Heparin-Bindestelle mit Protein erfolgen sollte, welches in einem eukaryontischen System dargestellt wurde.

6 Abkürzungen

L-APLP	<i>Amyloid Precursor-like Protein</i>
L-APP	<i>β-A4-Amyloid Protein Precursor</i>
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CV	Säulenvolumina
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDAC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
F	Farad
g	Zentrifugalkraft
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GlcA	Glukuronsäure
GlcAT-I	Glukuronsäuretransferase I
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Galaktosyltransferase
h	Stunde
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	kilo

L	Liter
m	Milli
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
μ	Mikro
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
N	Nano
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
U	Unit
UDP	Uracildiphosphat
V	Volt
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

7 Literatur

1. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science, 2002.
2. Kjellen, L. and U. Lindahl, *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-75.
3. Iozzo, R.V., *Matrix Proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 609-52.
4. Prydz, K. and K.T. Dalen, *Synthesis and sorting of proteoglycans*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 2**: p. 193-205.
5. Kreis, T. and R. Vale, *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. ed. s. edition., San Francisco: Oxford University Press, 1999.
6. Hascall, V.C., *Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid*. J Supramol Struct, 1977. **7(1)**: p. 101-20.
7. Hardingham, T.E., A.J. Fosang, and J. Dudhia, *The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32(4)**: p. 249-57.
8. Hardingham, T., *Proteoglycans: many forms and many functions*. FASEB J, 1992. **6**: p. 861-70.
9. Reed, C.C. and R.V. Iozzo, *The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis*. Glycoconj J, 2002. **19(4-5)**: p. 249-55.
10. Redini, F., [*Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression*]. Pathol Biol (Paris), 2001. **49(4)**: p. 364-75.
11. Markmann, A., et al., *Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction*. Matrix Biol, 2000. **19(7)**: p. 631-6.
12. Teicher, B.A., et al., *Optimal scheduling of interleukin 12 and chemotherapy in the murine MB-49 bladder carcinoma and B16 melanoma*. Clin Cancer Res, 1997. **3(9)**: p. 1661-7.
13. Taipale, J. and J. Keski-Oja, *Growth factors in the extracellular matrix*. FASEB J, 1997. **11(1)**: p. 51-9.
14. Lamoureux, F., et al., *Proteoglycans: key partners in bone cell biology*. Bioessays, 2007. **29(8)**: p. 758-71.
15. Lindahl, U. and M. Hook, *Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 385-417.
16. Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. Glycobiology, 2000. **10(10)**: p. 951-8.
17. Haynes, P.A., *Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation?* Glycobiology, 1998. **8(1)**: p. 1-5.
18. Salmivirta, M., K. Lidholt, and U. Lindahl, *Heparan sulfate: a piece of information*. FASEB J, 1996. **10(11)**: p. 1270-9.
19. Esko, J.D. and U. Lindahl, *Molecular diversity of heparan sulfate*. J Clin Invest, 2001. **108(2)**: p. 169-73.
20. Kolset, S.O., K. Prydz, and G. Pejler, *Intracellular proteoglycans*. Biochem J, 2004. **379(Pt 2)**: p. 217-27.
21. Scott, J.E., *Keratan sulphate--a 'reserve' polysaccharide?* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32(4)**: p. 217-23.

22. Lee, J.Y. and A.P. Spicer, *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(5): p. 581-6.
23. O'Regan, M., et al., *Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis*. *Int J Biol Macromol*, 1994. **16**(6): p. 283-6.
24. Laurent, T.C., *Biochemistry of hyaluronan*. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1987. **442**: p. 7-24.
25. Paulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
26. Unligil, U.M. and J.M. Rini, *Glycosyltransferase structure and mechanism*. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. **10**(5): p. 510-7.
27. Coutinho, P.M., et al., *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. *J Mol Biol*, 2003. **328**(2): p. 307-17.
28. Campbell, J.A., et al., *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. *Biochem J*, 1997. **326** (Pt 3): p. 929-39.
29. Breton, C., et al., *Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases*. *J Biochem*, 1998. **123**(6): p. 1000-9.
30. El-Battari, A., et al., *Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation*. *Glycobiology*, 2003. **13**(12): p. 941-53.
31. Lairson, L.L., et al., *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 521-55.
32. Uyama, T., et al., *Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 3072-8.
33. Sato, T., et al., *Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 3063-71.
34. Kitagawa, H., et al., *Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(26): p. 23666-71.
35. Kitagawa, H., H. Shimakawa, and K. Sugahara, *The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13933-7.
36. Pedersen, L.C., et al., *Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14420-8.
37. Wuyts, W. and W. Van Hul, *Characterization and genomic localization of the mouse Extl2 gene*. *Cytogenet Cell Genet*, 2000. **89**(3-4): p. 185-8.
38. Schwartz, N.B., *Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein*. *J Biol Chem*, 1977. **252**(18): p. 6316-21.
39. Götting, C., J. Kuhn, and K. Kleesiek, *Human xylosyltransferases in health and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(12): p. 1498-517.
40. Kearns, A.E., et al., *Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase*. *Biochemistry*, 1991. **30**(30): p. 7477-83.

41. Schön, S., et al., *Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14224-31.
42. Götting, C., et al., *Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(6): p. 919-24.
43. Brinkmann, T., C. Weilke, and K. Kleesiek, *Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11171-5.
44. Kuhn, J., et al., *Xylosyltransferase I acceptor properties of fibroblast growth factor and its fragment bFGF (1-24)*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(1): p. 156-66.
45. Weilke, C., T. Brinkmann, and K. Kleesiek, *Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor*. Clin Chem, 1997. **43**(1): p. 45-51.
46. Campbell, P., et al., *Silk--a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*. Anal Biochem, 1984. **137**(2): p. 505-16.
47. Kuhn, J., et al., *Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2006. **52**(12): p. 2243-9.
48. Götting, C., et al., *Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis*. J Mol Med, 2005. **83**(12): p. 984-92.
49. Prante, C., et al., *Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26441-9.
50. Prante, C., et al., *The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2252-61.
51. Götting, C., J. Kuhn, and K. Kleesiek, *Serum xylosyltransferase activity in diabetic patients as a possible marker of reduced proteoglycan biosynthesis*. Diabetes Care, 2008. **31**(10): p. 2018-9.
52. Götting, C., et al., *Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II*. J Mol Biol, 2000. **304**(4): p. 517-28.
53. Kuhn, J., et al., *First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4940-7.
54. Pönighaus, C., et al., *Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5201-6.
55. Voglmeir, J., R. Voglauer, and I.B. Wilson, *XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 5984-90.
56. Cuellar, K., et al., *Biosynthesis of chondroitin and heparan sulfate in chinese hamster ovary cells depends on xylosyltransferase II*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5195-200.
57. Fransson, L., et al., *Proteoheparan sulfate from human skin fibroblasts. Evidence for self- interaction via the heparan sulfate side chains*. J. Biol. Chem., 1983. **258**(23): p. 14342-14345.
58. Levy-Adam, F., et al., *Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20457-66.

59. Redini, F., et al., *Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives*. Biochem J, 1988. **252**(2): p. 515-9.
60. Yu, W. and J.S. Hill, *Mapping the heparin-binding domain of human hepatic lipase*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 659-65.
61. Shing, Y., et al., *Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor*. Science, 1984. **223**(4642): p. 1296-9.
62. Krilleke, D., et al., *Molecular mapping and functional characterization of the VEGF164 heparin-binding domain*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28045-56.
63. Faham, S., et al., *Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1116-20.
64. Lau, E.K., et al., *Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22294-305.
65. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-8.
66. Kuschert, G.S., et al., *Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8*. Biochemistry, 1998. **37**(32): p. 11193-201.
67. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
68. Petitou, M., J.C. Lormeau, and J. Choay, *Interaction of heparin and antithrombin III. The role of O-sulfate groups*. Eur J Biochem, 1988. **176**(3): p. 637-40.
69. Ragazzi, M., et al., *Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin to antithrombin-III*. Carbohydr Res, 1987. **165**(1): p. c1-5.
70. Kouzi-Koliakos, K., et al., *Mapping of three major heparin-binding sites on laminin and identification of a novel heparin-binding site on the B1 chain*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17971-8.
71. Delacoux, F., et al., *Unraveling the amino acid sequence crucial for heparin binding to collagen V*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29377-82.
72. San Antonio, J.D., et al., *Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils*. J Cell Biol, 1994. **125**(5): p. 1179-88.
73. Bhikhabhai, R., et al., *Purification, characterization and crystallization of recombinant HIV-1 reverse transcriptase*. J Chromatogr, 1992. **604**(1): p. 157-70.
74. Kaznadzei, D.V., et al., *[Proteins, interacting with the promotor of the immunoglobulin kappa gene]*. Mol Biol (Mosk), 1993. **27**(5): p. 1023-31.
75. Van Putten, J. and S. Paul, *Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for Neisseria gonorrhoeae entry into human mucosal cells*. EMBO Journal, 1995. **14**(10): p. 2144-2154.
76. Pethe, K., et al., *Characterization of the Heparin-binding Site of the Mycobacterial Heparin-binding Hemagglutinin Adhesin*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(19): p. 14273-14280.
77. WuDunn, D. and P. Spear, *Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate*. Journal of Virology, 1989. **63**(1): p. 52.
78. Crublet, E., et al., *The HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 Features Four Heparan Sulfate Binding Domains, Including the Co-receptor Binding Site*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(22): p. 15193.
79. Kleesiek, K., et al., *UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase: a new marker of cartilage destruction in chronic joint diseases*. J Clin Chem Clin Biochem, 1987. **25**(8): p. 473-81.
80. Cardin, A.D. and H.J. Weintraub, *Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions*. Arteriosclerosis, 1989. **9**(1): p. 21-32.

81. Margalit, H., N. Fischer, and S.A. Ben-Sasson, *Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19228-31.
82. Verrecchio, A., et al., *Design of peptides with high affinities for heparin and endothelial cell proteoglycans*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7701-7.
83. Vives, R.R., et al., *A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54327-33.
84. Keil, B., *Specificity of Proteolysis*. 1992: Springer-Verlag Berlin, Germany.
85. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
86. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
87. Tornqvist, H. and P. Belfrage, *Determination of protein in adipose tissue extracts*. J Lipid Res, 1976. **17**(5): p. 542-5.
88. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
89. Kuhn, J., et al., *High-density tissue-like cultivation of JAR choriocarcinoma cells for the in vitro production of human xylosyltransferase*. J Biotechnol, 2003. **103**(2): p. 191-6.
90. Conlan, L.H., et al., *Modulating restriction endonuclease activities and specificities using neutral detergents*. Biotechniques, 1999. **27**(5): p. 955-60.
91. Wilson, I.B., *Functional characterization of Drosophila melanogaster peptide O-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/I N-acetylglucosaminyltransferase family*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21207-12.
92. Gilbert, M., et al., *Biosynthesis of ganglioside mimics in Campylobacter jejuni OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3896-906.
93. Grebner, E.E. and E.F. Neufeld, *Stimulation of a protein glycosylation reaction by lysozyme*. Biochim Biophys Acta, 1969. **192**(2): p. 347-9.
94. Manzella, S., et al., *Inhibition of glycogenin-catalyzed glucosyl and xylosyl transfer by cytidine 5'-diphosphate and related compounds*. Arch Biochem Biophys, 1995. **320**(2): p. 361-8.
95. Smith, D.B. and K.S. Johnson, *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase*. Gene, 1988. **67**(1): p. 31-40.
96. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
97. Mannervik, B. and U.H. Danielson, *Glutathione transferases--structure and catalytic activity*. CRC Crit Rev Biochem, 1988. **23**(3): p. 283-337.
98. di Guan, C., et al., *Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein*. Gene, 1988. **67**(1): p. 21-30.
99. Maina, C.V., et al., *An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein*. Gene, 1988. **74**(2): p. 365-73.
100. Kapust, R.B. and D.S. Waugh, *Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused*. Protein Sci, 1999. **8**(8): p. 1668-74.

101. Kellermann, O.K. and T. Ferenci, *Maltose-binding protein from Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 1982. **90 Pt E**: p. 459-63.
102. Götting, C., et al., *Xylosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase*. *J Protein Chem*, 1998. **17**(3): p. 295-302.
103. Pikas, D., I. Eriksson, and L. Kjellen, *Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns*. *Biochemistry*, 2000. **39**(15): p. 4552-8.
104. Duncan, M.B., et al., *Characterization of the N-deacetylase domain from the heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **339**(4): p. 1232-7.
105. Kim, B.T., et al., *In vitro heparan sulfate polymerization: crucial roles of core protein moieties of primer substrates in addition to the EXT1-EXT2 interaction*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(43): p. 41618-23.
106. Busse, M. and M. Kusche-Gullberg, *In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(42): p. 41333-7.
107. Ramesh, K.S. and N. Appaji Rao, *Purification and physicochemical, kinetic and immunological properties of allosteric serine hydroxymethyltransferase from monkey liver*. *Biochem J*, 1980. **187**(3): p. 623-36.
108. Götting, C., et al., *High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells*. *Mol Hum Reprod*, 2002. **8**(12): p. 1079-86.
109. Habuchi, H., O. Habuchi, and K. Kimata, *Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(8): p. 4172-9.
110. Maimone, M.M. and D.M. Tollefsen, *Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(22): p. 14830.
111. Capila, I. and R.J. Linhardt, *Heparin-protein interactions*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(3): p. 391-412.
112. Müller, S., et al., *Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme*. *Biochem J*, 2006. **394**(Pt 1): p. 163-71.
113. Baker, T.A., A.D. Grossman, and C.A. Gross, *A gene regulating the heat shock response in Escherichia coli also affects proteolysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(21): p. 6779-83.
114. Derewenda, Z., *The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization*. *Methods*, 2004. **34**(3): p. 354-363.
115. Nishihara, K., et al., *Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(3): p. 884-9.
116. Burgess-Brown, N.A., et al., *Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study*. *Protein Expr Purif*, 2008. **59**(1): p. 94-102.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe.

Bad Oeynhausen, den 01 Dezember 2008

Javier Carrera Casanova