

Expression und Charakterisierung der humanen Fucosyltransferase V

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jan Münster
aus Elmshorn

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst der Universität Hamburg durchgeführt.

Tag der Disputation: 17. Juni 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Gercken

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonsäure)
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indoyphosphat
BRS	<i>broad range standard</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CIAP	Alkalische Phosphatase (<i>Calf intestinal alkaline Phosphatase</i>)
Cys	Cystein
DHB	Dihydroxy-Benzoessäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Didesoxynukleotid
dpm	<i>disintegrations per minute</i>
DSA	<i>Datura stramonium Agglutinin</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
FKS	Fötale Kälberserum
FucT	Fucosyltransferase
GNA	<i>Galanthus nivalis Agglutinin</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IMAC	<i>Immobilized metallion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
LB	Lurea-Bertain
MAA	<i>Maackia amurensis Agglutinin</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
MBP	Maltose Binding Protein
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MOI	Multiplicity of Infection
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungen

PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>Plaque forming units</i>
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
Ser	Serin
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SNA	<i>Sambucus nigra Agglutinin</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
TAE	Tris.Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TSS	Transformation and Storage Solution for chemical transformation
U	Units
wt	Wild-Typ
xg	Mehrfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactosid

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Bedeutung von N-Glycanen	1
1.2	Glycosyltransferasen	2
1.3	α -1,3/4-Fucosyltransferasen	4
1.3.1	Die Lewis-Gruppe	5
1.3.2	Das Myeloid-Enzym: Fucosyltransferase IV	7
1.3.3	Das Leukozyten-Enzym: Fucosyltransferase VII	7
1.3.4	Das Neuronale-Enzym: Fucosyltransferase IX	7
1.3.5	Reaktionsmechanismus	8
1.3.6	Biologische Bedeutung der α -1,3/4-Fucosyltransferasen	8
1.3.7	Fucosyltransferase-Inhibitoren	10
1.3.8	Struktur/Funktions-Beziehungen	12
1.3.9	Rekombinante Expression humaner α 1,3/4-Fucosyltransferasen	14
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
2	Material	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Enzyme, Proteine und Antikörper	17
2.3	Affinitätsmatrices und Partikel	17
2.4	Bakterien und Hefestämme	17
2.5	Vektoren	18
2.6	Zelllinien und Kultur	19
2.7	Lösungen	19
2.8	Medien	22
2.9	Oligonukleotide	22
2.10	Bibliotheken und Phagen	22
3	Methoden	25
3.1	Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	25
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA mit käuflichen Kits	25
3.1.3	Quantifizierung von DNA	25
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.1.5	Dephosphorylierung	26
3.1.6	Alkoholpräzipitation der DNA	27
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.1.8	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	27

3.1.9	Ligation	27
3.1.10	Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen	28
3.1.11	Transformation	28
3.1.12	Lagerung von <i>E. coli</i> Klonen	28
3.1.13	DNA-Sequenzierung	29
3.1.14	Ortsspezifische Mutagenese	29
3.2	Phagentechniken	30
3.2.1	Phagen Display	30
3.2.2	Selektion der Peptidbibliothek	30
3.2.3	Titerbestimmung	30
3.2.4	Amplifikation selektierter Phagen	30
3.2.5	Phagen-DNA-Präparation zur Sequenzierung	31
3.2.6	Polyklonale ELISA-Analyse	31
3.2.7	Monoklonale ELISA-Analyse	32
3.2.8	Selektion	32
3.3	Proteinbiochemische Methoden	33
3.3.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	33
3.3.2	Coomassie-Färbung von Proteinbanden	33
3.3.3	Silberfärbung von Proteinbanden	33
3.3.4	Trocknen von Polyacrylamidgelen	34
3.3.5	Western Blot	34
3.3.6	Proteinbestimmung	34
3.3.7	Zellaufschluß von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	34
3.3.8	Säulenchromatographische Verfahren	35
3.3.9	IMAC (<i>Immobilized metallion affinity chromatography</i>)	35
3.3.10	Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate	35
3.3.11	Isolierung von rekombinanter Fucosyltransferase V	36
3.3.12	FCS Messungen	38
3.3.13	Test zur Bestimmung der Fucosyltransferase V-Aktivität	38
3.3.14	Test zur Bestimmung der DHFR-Aktivität	40
3.4	Immunologische Methoden	41
3.4.1	Präparation von Immunisierungsproben	41
3.4.2	Immunisierung	41
3.4.3	Gewinnung von Antiseren	41
3.4.4	Anreicherung von Antikörpern aus Antiseren	41
3.4.5	Immuno-Blot	42
3.5	Baculovirus-Expressionssystem	42
3.5.1	Zellkultur	42
3.5.2	Aufbewahrung von Insektenzellen	42
3.5.3	Transfektion von Sf9 Zellen	43

3.5.4	Plaque Isolierung rekombinanter Baculoviren	43
3.5.5	Amplifikation rekombinanter Viren	44
3.5.6	Titerbestimmung	44
3.6	Stabile Expression in Insektenzellen	44
3.6.1	Transfektion	45
3.6.2	Expression unter Selektionsdruck	45
3.7	Expression von Fucosyltransferase V in Säugetierzellen	45
3.7.1	Kultivierung und Passagieren von CHO- und HEK293-Zellen	45
3.7.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	46
3.7.3	Transfektion	46
3.7.4	Expression unter Selektionsdruck	46
3.8	Chemische Modifikation von Proteinen und Peptiden	47
3.8.1	FITC-Markierung von Peptiden	47
3.8.1.1	HPLC-Reinigung	47
3.8.1.2	MALDI-TOF	47
3.8.2	Biotin-Markierung von Proteinen	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Rekombinante Expression der humanen Fucosyltransferase V	49
4.1.1	Amplifikation und Klonierung der Fucosyltransferase V cDNA aus HEK 293 Zellen	49
4.1.2	Expression der Fucosyltransferase V in <i>E. coli</i>	50
4.1.2.1	Versuche zur Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate	51
4.1.2.2	Klonierung und Expression der Fucosyltransferase V als MBP-Fusionsprotein	53
4.1.2.3	Erzeugung von anti-Fucosyltransferase V Antisera	55
4.1.3	Expression der Fucosyltransferase V in Säugetierzellen	55
4.1.4	Expression der Fucosyltransferase V mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystem	58
4.1.4.1	Klonierung unterschiedlicher Transfervektoren und Generierung rekombinanter Baculoviren	59
4.1.4.2	Expression der Fucosyltransferase V	59
4.1.4.3	Reinigung der rekombinanten Fucosyltransferase V	63
4.1.5	Stabile Expression der Fucosyltransferase V in Insektenzellen	64

4.1.5.1	Klonierung und Expression	65
4.2	Strukturelle Untersuchung der rekombinanten humanen Fucosyltransferase V	66
4.2.1	Einfluß der Dimerisierung auf die enzymatische Aktivität	66
4.2.1.1	Identifizierung der für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren	67
4.2.2	Untersuchung der Glycanstrukturen der rekombinanten Fucosyltransferase V	70
4.3	Selektion von Peptid-Bibliotheken gegen die Fucosyltransferase V	72
4.3.1	Entwicklung und Charakterisierung linearer Peptid-Inhibitoren gegen die Fucosyltransferase V	75
4.3.2	Entwicklung und Charakterisierung zirkulärer Peptid-Inhibitoren gegen die Fucosyltransferase V	77
4.3.3	Charakterisierung synthetischer Peptide	79
5	Diskussion	83
5.1	Expression der Fucosyltransferase V	83
5.2	Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen	91
5.3	Darstellung von peptidischen Liganden gegen die Fucosyltransferase V aus kombinatorischen Bibliotheken	94
5.4	Ausblick	97
6	Zusammenfassung	99
7	Summary	101
	Literatur	103
	Anhang	117
	Danksagung	119

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Strategie zur Expression großer Mengen der humanen Fucosyltransferase V etabliert. Nach Erhalt des gereinigten rekombinanten Proteins wurden verschiedene Fragestellungen hinsichtlich der strukturellen Eigenschaften des Enzyms untersucht. Dabei bildeten die Aufklärung der N-Glycosylierung in Insektenzellen und die Ausbildung von intermolekularen sowie intramolekularen Disulfidbrücken die Schwerpunkte der strukturellen Untersuchungen. Zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Fucosyltransferase V wurden mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie unterschiedliche Peptid-Bibliotheken gegen das Enzym selektiert.

1.1 Biologische Bedeutung von N-Glycanen

Fast alle Proteine des Blutserums und auf Zelloberflächen sind glycosyliert; daher werden große Anstrengungen unternommen, die biologische Bedeutung dieser Kohlenhydrate näher zu untersuchen.

Bei Glycoproteinen erfolgt die Verknüpfung des Kohlenhydratanteils entweder O- oder N-glycosidisch an das Protein. O-Glycane sind an die Aminosäureseitenkette von Serin oder Threonin gebunden. N-Glycane sind an die Seitenketten von Asparagin gebunden. Die Erkennungssequenz für N-Glycane lautet Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann (Marshall, 1974).

Die Biosynthese von Glycoproteinen erfolgt in zwei Schritten: Die Proteinsequenz wird genetisch determiniert, während die Synthese von Kohlenhydraten enzymatisch erfolgt. Der wichtigste Teil der Biosynthese der N-Glycoproteine findet im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Ein durch das *Carrier*-Lipid Dolicholpyrophosphat aktiviertes Oligosaccharid aus 14 Zuckereinheiten wird durch eine Oligosaccharyltransferase auf die wachsende ribosomale Peptidkette übertragen. Man nennt diesen Vorgang die kotranslationale Glycosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1976). Im Gegensatz dazu erfolgt die Biosynthese des Kohlenhydratanteils von Glycolipiden oder O-Glycanen im Golgi-Apparat (Spiro, 1973).

Glycoproteine liegen in einer hohen strukturellen Vielfalt vor und weisen dabei Unterschiede in Anzahl und Sequenz der Seitenketten auf. Durch weitere Modifikationen wie Acetylierung, Phosphatierung und Sulfatierung erhöht sich zusätzlich die Diversität der Glycoproteine. Das Glycosylierungsmuster variiert mit der Struktur des Proteins, dem Zelltyp und dem Organis-

mus. Durch verzweigende N-Acetylglucosaminyltransferasen sowie verlängernde Galactosyl-, Sialyl- und Fucosyltransferasen können zahlreiche unterschiedliche Oligosaccharidstrukturen an einer Glycosylierungsstelle entstehen (Marz und Hattton, 1984 und Schachter, 1991).

N-Glycosylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung neu gebildeter Glycoproteine im endoplasmatischen Retikulum, indem der Zuckeranteil mit der naszierenden Polypeptidkette verknüpft und so hydrophobe Bereiche abgeschirmt werden. Dadurch wird die Löslichkeit von Faltungsintermediaten erhöht und die Aggregation nicht vollständig gefalteter Proteine verhindert (Chu *et al.*, 1985). Spezifische kohlenhydratbindende Chaperone wie Calnexin und Calreticulin sorgen im ER zusätzlich für eine Qualitätskontrolle der neugebildeten Glycoproteine. Diese Moleküle sind durch die Bindung an die Zuckerstrukturen an einen Glycoprotein-spezifischen Chaperon-Zyklus beteiligt, der dafür sorgt, daß nur korrekt gefaltete Proteine in den Golgi-Apparat weitergeleitet werden (Stronge *et al.*, 2001 und Schrag *et al.*, 2003).

Eine weitere wichtige biologische Funktion von N-Glycanen besteht in der Regulierung der Halbwertszeiten von Serumproteinen. So regulieren sulfatierte GalNAc-Strukturen die Lebensdauer von Hormonen wie z.B. Lutropin, Thyrotropin und Pro-Opiomelanocortin, indem Rezeptoren der Leber-Endotelzellen diese Zucker erkennen und so die Hormone rasch aus dem Blutkreislauf entfernt werden können (Baenziger *et al.*, 1992 und Smith und Baenziger, 1992)

Die vielseitigste Aufgabe von N-Glycanen besteht jedoch in ihrer Funktion als Liganden für Lektine. Bei Lektinen handelt es sich um Kohlenhydratbindende Proteine, die zur Erkennung spezifischer Glycanstrukturen dienen. Lektine spielen eine Rolle in unterschiedlichsten biologischen Vorgängen wie z.B. Blutgerinnung, Apoptose, Adhäsion an Gewebeoberflächen und das Leiten von Enzymen oder Zellen an ihren Bestimmungsort (Lee, 1992).

1.2 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen spielen eine entscheidende Rolle in der Glycobiosynthese. Diese Enzyme sind in der Lage, einzelne Zucker auf einen Akzeptor zu übertragen.

Glycosyltransferasen sind meist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, wo neu synthetisierte Glykokonjugate ihre endgültige Zuckerstruktur erhalten und für ihre Sekretion vorbereitet werden (Kleene und Berger, 1993). Obwohl es sich bei den Glycosyltransferasen um eine sehr große heterogene Gruppe von Enzymen handelt, zeigen sie eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten. Sie katalysieren eine Transglycosylierungsreaktion, bei der das Monosaccharid von

einem energiereichen Nucleotidzucker-Donor (siehe Tabelle 1.1) auf einen Akzeptor übertragen wird. Die Akzeptoren sind in den meisten Fällen selbst Oligosaccharide, obwohl es auch Glycosyltransferasen gibt, die Zucker auf die Hydroxylgruppe von Threonin oder Serin übertragen können (Fukuda *et al.*, 1996).

Glycosyldonoren	Akzeptoren
CMP-Sialinsäure	Oligosaccharide
GDP-Fucose	Monosaccharide
GDP-Mannose	Proteine
UDP-Galactose	Lipide (Ceramide)
UDP-N-Acetylgalactosamin	
UDP-Glucose	
UDP-Glucuronsäure	
UDP-Xylose	
Dolichol-P-Glucose	
Dolichol-P-Mannose	
Dolichol-P-(Glucose ₃ - Mannose ₉ -N-Acetylglucosamin ₂)	

Tabelle 1.1 Auflistung unterschiedlicher Donor- und Akzeptorsubstrate der Glycosyltransferasen.

Glycosyltransferasen zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität aus. Sie sind sowohl hochgradig substratspezifisch als auch regio- und stereospezifisch (Paulson und Colley, 1989). So überträgt die menschliche B-Blutgruppen-Galactosyltransferase Galactose auf die 3-OH-Gruppe einer Akzeptorgalactose, wobei am anomeren Zentrum die α -Konfiguration gebildet wird. Ausschließlich UDP-Gal wird als Donorsubstrat akzeptiert und eine β -Verknüpfung wurde nie beobachtet. Die 3-OH-Gruppe der Akzeptorgalactose ist die einzige Transglycosylierungsstelle, und auch 3-OH-Gruppen anderer Zucker dienen nicht als Substrat. Einige Glycosyltransferasen bilden jedoch Ausnahmen von dieser Regel. So ist die Fucosyltransferase III durchaus in der Lage, zwei unterschiedliche glycosidische Bindungen zu bilden.

Glycosyltransferasen einer Familie weisen meist hohe Sequenzhomologien auf und zeigen auch dann noch ein hohes Maß an konservierten Sequenzen, wenn die Enzyme aus wenig verwandten Spezies stammen. Unterschiedliche Familien von Glycosyltransferasen dagegen weisen meist keine Sequenzhomologien auf. Trotz der teilweise sehr unterschiedlichen Primärstruktur haben alle

Golgi-Glycosyltransferasen einen ähnlichen Aufbau. Bei den Glycosyltransferasen handelt es sich um Typ II Transmembranproteine, bestehend aus einem kurzen N-terminalen cytosolischen Bereich, einer Transmembrandomäne und der katalytischen Domäne. Die Transmembrandomäne und die katalytische Domäne werden durch einen Bereich getrennt, der *Stem*-Region genannt wird (Breton *et al.*, 1998).

Viele Glycosyltransferasen können in der *Stem*-Region proteolytisch gespalten und so sekretiert werden. Verantwortlich für diese Spaltung sind wahrscheinlich Cathepsin-ähnliche Proteasen, die im *trans*-Golgi aktiv sind (Lammers und Jamieson, 1990). Obwohl von einigen Glycosyltransferasen große Aktivitäten in unterschiedlichsten Körperflüssigkeiten detektierbar sind, ist die biologische Funktion dieser sekretierten Formen unklar (Weinstein *et al.*, 1987). Es scheint unwahrscheinlich, daß außerhalb des Golgi-Apparats in den Körperflüssigkeiten die Konzentration an Substraten hoch genug ist, um von Glycosyltransferasen in einer Transglycosylierungsreaktion umgesetzt werden zu können. Eine mögliche biologische Funktion der sekretierten Enzyme kann in der lektinähnlichen Bindung an die Akzeptorsubstrate liegen (Yamamoto *et al.*, 1990).

1.3 α -1,3/4-Fucosyltransferasen

α 1,3/4-Fucosyltransferasen katalysieren den Transfer von Fucose von dem Nucleotid-Zucker GDP-Fucose auf ein Akzeptorsubstrat und bilden eine α 3- oder α 4-Bindung zu GlcNAc in Gal-GlcNAc-Zuckerstrukturen (Javaud *et al.*, 2003). Dadurch entstehen wichtige Strukturen wie Lewis^a, Sialyl-Lewis^a, Lewis^x sowie Sialyl-Lewis^x, die als Antigene für Selektine dienen und an vielen biologischen Funktionen beteiligt sind (Abbildung 1.1).

Die ursprüngliche Nomenklatur der verschiedenen Isoformen von Fucosyltransferasen basiert auf der Benennung der FucT I und FucT II, deren Aktivitäten in lektinresistenten CHO-Zellen gefunden wurden (Howard *et al.*, 1987) und auf später identifizierte Fucosyltransferasen übertragen wurde (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990). Danach werden Fucosyltransferasen als FucT bezeichnet und die Isoform mit einer römischen Zahl angegeben. Da diese Art der Bezeichnung sowohl das Protein als auch das Gen beschreibt, wurde sie so abgeändert, daß das Gen mit großen Buchstaben und arabischen Zahlen bezeichnet wird. So ist zum Beispiel die FucT III das Enzym, welches von dem *FUT3* Gen kodiert wird (Costache *et al.*, 1997b und Costache *et al.*, 1997a).

Beim Menschen sind bisher sechs α 1,3/4-Fucosyltransferasen identifiziert worden, FucT III bis FucT VII und die FucT IX (Kukowska-Latallo *et al.*,

Antigen	Struktur
Le ^a	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1,4 Fuc
Sialyl-Le ^a	SA α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1,4 Fuc
Le ^x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1,3 Fuc
Sialyl-Le ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1,3 Fuc

Abbildung 1.1 Zuckermotive mit peripheren Fucosylierungen, wie sie durch α 1,3/4-Fucosyltransferasen gebildet werden.

1990, Weston *et al.*, 1992b, Weston *et al.*, 1992a, Lowe *et al.*, 1991b, Sasaki *et al.*, 1994, Natsuka *et al.*, 1994 und Nishihara *et al.*, 1999). Die verschiedenen Isoformen werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert und haben unterschiedliche Akzeptor-Substrat-Spezifitäten. *In vitro* wurden die unterschiedlichen Spezifitäten bestätigt (Grabenhorst *et al.*, 1998) (Tabelle 1.2).

Name nach Lowe <i>et al.</i>		Verknüpfung	Synthetisierte Epitope
Fuc TIII	Lewis-Typ	α 1,3/4	Le ^a , sLe ^a , Le ^x , sLe ^x
Fuc TIV	Myeloid-Typ	α 1,3	Le ^x
Fuc TV		α 1,3	Le ^x , sLe ^x
Fuc TVI	Plasma-Typ	α 1,3	Le ^x , sLe ^x
Fuc TVII		α 1,3	sLe ^x
Fuc TIX		α 1,3	Le ^x

Tabelle 1.2 Humane α 1,3/4-Fucosyltransferasen.

1.3.1 Die Lewis-Gruppe

Die Lewis-Gruppe besteht aus drei Enzymen: Der Fucosyltransferase III, dem „Lewis Enzym“ (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990), der Fucosyltransferase V

(Weston *et al.*, 1992a) und der Fucosyltransferase VI, dem „Plasma-Typ Enzym“ (Weston *et al.*, 1992b). Im Menschen sind die Gene für diese Enzyme auf dem Chromosom 19p13.3 nahe beieinander lokalisiert und haben mehr als 85 % Sequenzidentität. Etwa 10 % der Weltbevölkerung exprimiert keine Lewis Antigene und weist auch keine Lewis-Enzym-Aktivität auf, was darauf hindeutet, daß diese Gruppe von Enzymen keine essentielle Bedeutung besitzt (de Vries *et al.*, 2001).

Fucosyltransferase III-Aktivität wird in der Leber, der Gallen-Blase, der Niere und in der Muttermilch detektiert, jedoch nicht im Plasma. Das Enzym katalysiert die Bildung der $Fu\alpha 1,4GlcNAc$ - und der $Fu\alpha 1,4GlcNAc$ -Bindung und bildet die Lewis-Antigene Le^x , sLe^a , Le^a und sLe^a (Costa *et al.*, 1997a). Die $FucT$ III ist das einzige Enzym, das in der Lage ist, die Le^a Antigene *in vivo* zu synthetisieren.

Die Fucosyltransferase V katalysiert die Bildung der $Fu\alpha 1,3GlcNAc$ Bindung und produziert Le^x - und sLe^x -Strukturen (Abbildung 1.2). Das *FUT5*-Gen wird in Leber, Gehirn und Darm exprimiert. Da die Menge an mRNA gering ist, ist es unsicher, ob überhaupt eine signifikante Menge an Enzym gebildet wird, weshalb die biologische Bedeutung des Enzyms unklar ist (Cameron *et al.*, 1995).

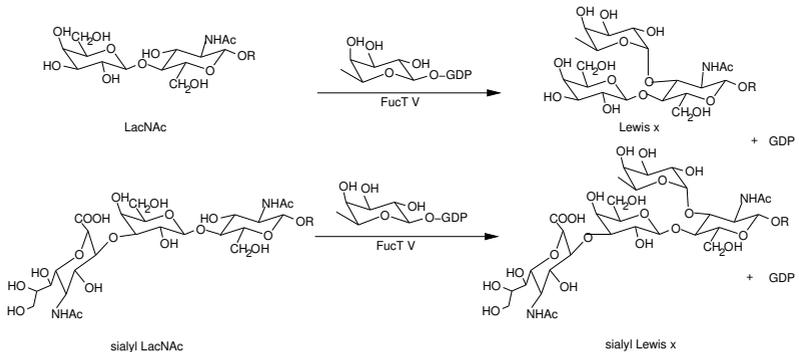


Abbildung 1.2 Die von der Fucosyltransferase V katalysierte Reaktion: Das Enzym ist in der Lage, sowohl das ungeladene Akzeptorsubstrat LacNAc als auch das geladene Sialyl-LacNAc umzusetzen.

Die Fucosyltransferase VI ist das dritte Mitglied dieser Gruppe von $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen und wurde ebenfalls von Weston 1992 erstmals beschrieben (Weston *et al.*, 1992a). Die Nucleotidsequenz des Enzyms ist zu 85 % mit der $FucT$ III-Sequenz und zu 89 % mit der $FucT$ V-Sequenz identisch. Die

FucT VI kann Le^x- und sLe^x-Strukturen synthetisieren und wird als „*Plasma-Typ Enzym*“ bezeichnet.

1.3.2 Das Myeloid-Enzym: Fucosyltransferase IV

Die Fucosyltransferase IV wurde unabhängig von zwei Gruppen erstmals beschrieben (Goelz *et al.*, 1990 und Lowe *et al.*, 1991b). Da es zuerst im Zusammenhang mit der Bildung des Liganden für das endothel Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1 (ELAM-1) entdeckt wurde, war der ursprüngliche Name ELAM-1-Ligand Fucosyltransferase (ELEFT) und wird heute als FucT IV bezeichnet (Kumar *et al.*, 1991). Das Enzym fucosyliert GlcNAc mit einer α 3-Bindung in neutralen Akzeptormolekülen und produziert Le^x-Strukturen, es ist aber nicht in der Lage, sLe^x Strukturen zu bilden (de Vries *et al.*, 1995 und Niemela *et al.*, 1998). Das *FUT4*-Gen wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert und ist auf dem Chromosom 11q22-q23 lokalisiert (Gersten *et al.*, 1995). Die Hauptmenge an Protein findet man in myeloiden Zellen, Magen, Darm, Uterus und Niere (Gersten *et al.*, 1995).

1.3.3 Das Leukozyten-Enzym: Fucosyltransferase VII

Die Fucosyltransferase VII wurde unabhängig von zwei Gruppen erstmals beschrieben (Natsuka *et al.*, 1994 und Sasaki *et al.*, 1994). Das Enzym fucosyliert GlcNAc mit einer α 3-Bindung in sialylierten Akzeptoren und produziert sLe^x-, aber keine Le^x-Strukturen. Das menschliche *FUT7*-Gen ist auf dem Chromosom 9q34.3 lokalisiert und wird vorwiegend auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert (Maly *et al.*, 1996).

1.3.4 Das Neuronale-Enzym: Fucosyltransferase IX

Die jüngst gefundene Fucosyltransferase IX wurde aus einer murinen cDNA-Bibliothek kloniert (Kudo *et al.*, 1998). Beim Menschen liegt das Gen auf dem Chromosom 6q16 (Kaneko *et al.*, 1999a). Die *FUT9*-Gensequenz unterscheidet sich in hohem Maße von den der anderen α 1,3/4-Fucosyltransferasen, jedoch weisen die *FUT9*-Gene von Maus und Mensch eine sehr hohe Homologie auf. Das Enzym katalysiert die Synthese von Le^x-Strukturen, das Substrat ist ähnlich dem der Fucosyltransferase IV. Die FucT IX wird im Gehirn, Magen, Milz und Blutzellen exprimiert und spielt eine Rolle in der frühen menschlichen Embryogenese (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000).

1.3.5 Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus der Fucosyltransferasen wurde am Beispiel der humanen Fucosyltransferase V untersucht (Murray *et al.*, 1997). Es handelt sich dabei um eine geordnete sequentielle bi-bi-Reaktion, bei der der Transfer der Fucose mit einer Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum der L-Fucose einhergeht (Weston *et al.*, 1992a). Inhibitorstudien und Untersuchungen bezüglich des primären und sekundären Isotopeneffektes lassen vermuten, daß während der Reaktion ein geladener sp^2 -hybridisierter Übergangszustand entsteht und die glycosidische Bindung des Nucleotidzucker gebrochen wird, bevor die Bindung zum Akzeptor geknüpft wird (Murray *et al.*, 1997). Die vorgeschlagene Struktur des Übergangszustandes ist analog zur Struktur bei Glycosidasereaktionen; der Zucker bildet eine Halbsesselkonformation, bei der am anomeren C-Atom ein Oxacarbeniumion entsteht (Abbildung 1.3) (Norris *et al.*, 2004).

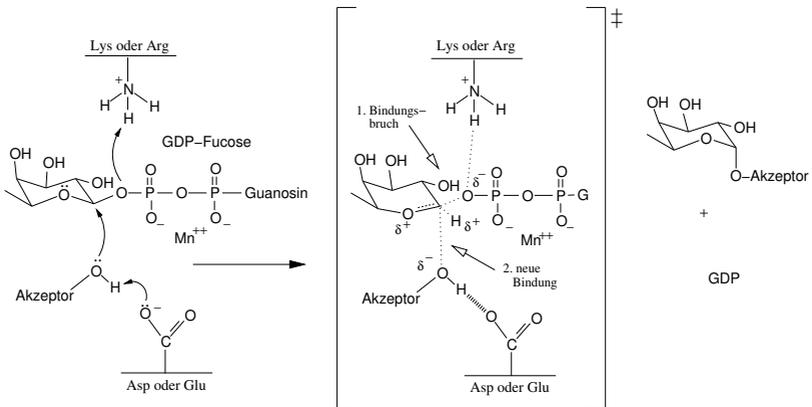


Abbildung 1.3 Enzymatischer Reaktionsmechanismus der Fucosyltransferase V nach dem von Murray vorgeschlagenen Modell (Murray *et al.*, 1997).

1.3.6 Biologische Bedeutung der α -1,3/4-Fucosyltransferasen

Die von den Fucosyltransferasen synthetisierten Lewis-Strukturen haben unterschiedliche biologische Funktionen und Veränderungen in ihrer Präsentation und werden mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert. Generell dienen

alle synthetisierten Lewis-Strukturen als Liganden für Selektine und sind somit an spezifischen Adhäsionsprozessen beteiligt.

Für die immunologische Antwort auf inflammatorische Prozesse ist es für den Organismus essentiell, Leukozyten an den Entzündungsherd zu leiten. Hierbei spielen E-, L- und P-Selektine eine bedeutende Rolle. Diese zuckerbindenden Moleküle werden auf der Oberfläche des Endothelium unter Einfluß von TNF- α , IL-1 α und IL-1 β exprimiert und sorgen somit für die ortsspezifische Adhäsion von Lymphozyten und der Transmigration an den Ort der Infektion. Als Liganden dieser Selektine dienen sialylierte Lewis^x-Strukturen, die auf den Lymphozyten exprimiert werden. Der letzte Schritt der Synthese dieser Zuckerstrukturen wird von den Fucosyltransferasen IV und VII katalysiert (Knibbs *et al.*, 1996). Bei Fucosyltransferase VII-defizienten Mäusen ist die Präsentation von sLe^x-Strukturen stark vermindert, was zur eingeschränkten Fähigkeit der Leukozyten führt, den intravaskulären Raum zu verlassen und zu dem Ort der Entzündung zu wandern (Maly *et al.*, 1996 und Lowe, 2003). Bei chronischen Hautentzündungen, wie atopischer Dermatitis und Psoriasis, kommt es zu einer Fehlleitung von T-Lymphozyten und damit zu einer ständigen Entzündungsreaktion in der Haut. Neue Ansätze in der Behandlung dieser Erkrankungen können in der Synthese von Fucosyltransferaseinhibitoren liegen, da gezeigt wurde, daß Fucosyltransferase VII-inhibierende Fluorozucker in der Lage waren, die Präsentation von sLe^x-Strukturen zu verringern und somit die Migration von Leukozyten einzuschränken (Dimitroff *et al.*, 2003 und Zollner und Asadullah, 2003).

Seit einigen Jahren sind sLewis^x- und sLewis^a-Strukturen als Tumor-assoziierte Antigene bekannt, so daß spezifische Antikörper gegen diese Strukturen in der Diagnostik eingesetzt werden können (Kumamoto *et al.*, 1998). Verantwortlich für die verstärkte Präsentation dieser Zuckerstrukturen ist in vielen Fällen die Überexpression von unterschiedlichen Fucosyltransferasen. So wird z.B. die FucT III in Colon-Carzinoma und Prostatakrebszellen, die FucT V in neoplastischen Geweben und Lungenkrebszellen, die FucT VI in Leberkrebszellen und die FucT VII in Lungenkrebszellen überexprimiert (Yamada *et al.*, 1997, Kannagi *et al.*, 2004, Martin-Satue *et al.*, 1998, Hada *et al.*, 1995 und Inaba *et al.*, 2003).

Die Überexpression der sLe^{a/x}-Strukturen steht in direktem Zusammenhang mit der Fähigkeit der Krebszelle, Metastasen zu bilden, so daß Patienten mit hoher sLe^{a/x}-Aktivität eine deutlich verschlechterte Prognose aufweisen (Holmes *et al.*, 1985, Nakamori *et al.*, 1997 und Jorgensen *et al.*, 1995). Die Fähigkeit zur Metastasierung wird erhöht, da durch die Bindung der sLe^{a/x}-Epitope an E-Selektine die im Blutkreislauf zirkulierenden Krebszellen an Endothelzellen adhären und so neue Tumoren bilden können (Kannagi, 1997).

Um die nur schwache Expression von E-Selektinen auf normalen Endothelzellen zu verstärken, ist die Krebszelle in der Lage, die Expressionsrate durch Ausschüttung von IL-1 α zu erhöhen. In *in vivo*-Versuchen wurde gezeigt, daß Zellkulturüberstände von Krebszellen in der Lage sind, auf kultivierten Endothelzellen die E-Selektinexpression zu erhöhen (Narita *et al.*, 1996 und Khatib *et al.*, 1999). Der direkte Zusammenhang zwischen der Überexpression von Fucosyltransferasen und der Metastasierung konnte belegt werden, indem antisense Oligonukleotide gegen die FucT III und -V in der Lage waren, die Adhäsion von Colon-Carzinoma-Zellen an Endothelzellen zu verringern (Weston *et al.*, 1999 und Klopocki *et al.*, 1998).

1.3.7 Fucosyltransferase-Inhibitoren

Die Überexpression von Lewis-Strukturen spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle, daher können Fucosyltransferase-Inhibitoren einen hohen therapeutischen Nutzen haben, da mit ihnen der letzte Schritt der Synthese dieser Strukturen verhindert werden kann.

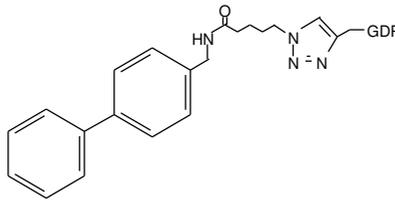
Eine wichtige Strategie, um potente Fucosyltransferase-Inhibitoren zu entwickeln, ist das Design und die Synthese von Substratanaloga. Der erste und einfachste Fucosyltransferase-Inhibitor dieser Sorte ist GDP mit einer Inhibitionskonstante von 29 μ M (Bella und Kim, 1971). Weitere GDP-Fuc analoge Substanzen wurden synthetisiert und auf ihre Eignung als Inhibitoren getestet. So konnte durch den Austausch des Fucosylmotivs gegen einen 5a-Carba-fuco-pyranosyl- (Pseudofucose-) Rest ein Inhibitor entworfen werden, der doppelt so potent ist wie GDP (Cai *et al.*, 1992). Das bisher beste Donormimetikum GDP-2F-Fucose wurde von Murray entwickelt und bindet an die Fucosyltransferase V mit einem $K_i = 2,4 \mu$ M (Murray *et al.*, 1997).

Eine weitere Methode, Fucosyltransferase-Inhibitoren zu entwickeln, ist die Synthese von Substanzen, die sich analog der Akzeptorzucker verhalten. Ein Beispiel hierfür ist das Gal β (1-4)deoxynojirimycin, welches ein schwacher Inhibitor der Fucosyltransferase V ist ($IC_{50} = 8-40$ mM) (Wong *et al.*, 1992). Durch die Synthese eines Azatrisaccharids, welcher dem Lewis-Trisaccharid ähnelt, konnte ein hochspezifischer Fucosyltransferase-Inhibitor entwickelt werden, dessen Bindungskonstante von $K_i = 2,4$ mM jedoch sehr gering ist (Qiao *et al.*, 1996).

Die Synthese von Übergangszustandanaloga ist eine weitere Methode zum Design von Inhibitoren. Unter der Annahme des in Abbildung 1.3 gezeigten Modells wurden einige Fucosyltransferase-Inhibitoren entwickelt. Ein Beispiel ist ein GDP-Azazucker, der die Fucosyltransferase V mit einem IC_{50} -Wert

von 45–82 mM inhibiert (Schuster und Blechert, 2001). Obwohl dieser Azazucker die vorgeschlagene Halbsesselkonfiguration einnimmt, ist er allerdings ein schlechterer Inhibitor als GDP.

Ein deutlich besserer Inhibitor wurde durch die Erstellung einer Bibliothek aus unterschiedlichen GDP-Triazol-Verbindungen entwickelt. Die 85 Kandidaten dieser Bibliothek wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Fucosyltransferase VI zu inhibieren. Die Substanz **1** erwies sich als Inhibitor mit einer Bindungskonstante von 62 nM und ist somit der erste Inhibitor einer Fucosyltransferase, dessen Bindungskonstante im nanomolaren Bereich liegt. Die Spezifität gegenüber anderen Fucosyltransferasen ist gering, außerdem werden andere Glycosyltransferasen nicht oder nur schwach inhibiert (Tabelle 1.3) (Lee *et al.*, 2003).

**1****Abbildung 1.4** Fucosyltransferase-Inhibitor (Lee *et al.*, 2003).

Enzym	IC ₅₀ (μM)	K _i (nM)
α -1,3-FucT III	1,0 ± 0,2	
α -1,3-FucT V	0,9 ± 0,1	270 ± 30
α -1,3-FucT VI	0,15 ± 0,03	62 ± 3
α -1,3-GalT	k.I	
β -1,4-GalT	k.I	
Guanylatkinase	250 ± 60	
Pyruvatkinase	k.I	

Tabelle 1.3 Inhibitionskonstanten der Verbindung **1**. k.I.: Keine Inhibition bei 600 μM.

Die bis heute entwickelten Fucosyltransferase-Inhibitoren weisen in den meisten Fällen eine geringe Bindungskonstante auf oder zeigen nur geringe Spezifitäten gegenüber ihrem Zielmolekül. Speziell die Inhibierung von nur einer ausgesuchten Fucosyltransferase erscheint aufgrund der geringen Spezifität bis heute nur schwer realisierbar. Aus diesem Grunde ist es notwendig, durch neue

Ansätze hochwirksame und spezifische Fucosyltransferase-Inhibitoren zu entwickeln.

1.3.8 Struktur/Funktions-Beziehungen

Fucosyltransferasen sind Typ-II-Transmembranproteine mit einer kurzen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer katalytischen Region, die im Golgi-Apparat lokalisiert ist. In Abbildung 1.5 ist die strukturelle Organisation der Fucosyltransferasen dargestellt. Fucosyltransferasen haben eine *Stem*-Region, welche sehr anfällig für proteolytische Spaltung sein kann und dafür sorgt, daß ein nicht unerheblicher Teil des aktiven Enzyms sekretiert wird. Lösliche Formen der Fucosyltransferasen wurden in Muttermilch, Serum, Samenflüssigkeit und anderen Körperflüssigkeiten gefunden (Mollicone *et al.*, 1990). Dabei haben die cytoplasmatische, die Transmembran- und die *Stem*-Domäne einen entscheidenden Einfluß auf das Maß der Sekretion sowie auf die Sublokalisierung im Golgi-Apparat (Grabenhorst und Conradt, 1999).

Die Tatsache, daß es eine lösliche aktive Form dieser Enzyme gibt, läßt vermuten, daß der N-Terminus für die enzymatische Aktivität nicht notwendig ist. Studien haben ergeben, daß zwischen 50 und 70 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt werden können, ohne daß es zu einer Verringerung der Aktivität kommt. Die Deletion nur weniger Aminosäuren am C-Terminus führt jedoch zu einem vollständigen Verlust der Aktivität (Xu *et al.*, 1996).

Aufgrund der Untersuchungen an den Fucosyltransferasen III und V, die sich in der katalytischen Domäne um weniger als 25 Aminosäurereste unterscheiden und trotzdem eine signifikant unterschiedliche Substratspezifität besitzen, konnten die Bindungstellen für das Substrat und den Akzeptor identifiziert werden. Aminosäuren, die verantwortlich für die Akzeptorspezifität sind, befinden sich im sogenannten hypervariablen Bereich, der sich bei der FucT III von der Aminosäure 73 bis zur Aminosäure 151 erstreckt (Xu *et al.*, 1996 und Dupuy *et al.*, 1999). Zusätzliche Aminosäurereste, die bei der Erkennung des Akzeptorzuckers eine Rolle spielen, befinden sich nahe des C-Terminus (Vo *et al.*, 1998). Für die Bindung von GDP-Fucose sind mehrere Aminosäuren verantwortlich, die sich in mindestens drei Regionen des Proteins befinden (Martin *et al.*, 1997).

Sämtliche humane α 1,3/4-Fucosyltransferasen besitzen vier konservierte Cystein-Reste, die über Disulfidbrücken den C-terminalen Bereich in die Nähe des Bereiches der katalytischen Domäne bringen, der direkt an die *Stem*-Region grenzt. Bei der Fucosyltransferase VII existieren sogar sechs Cysteine, die durch drei Disulfidbrücken den N- bzw. C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne hinsichtlich ihrer Struktur ihre Stabilität verleihen (de Vries

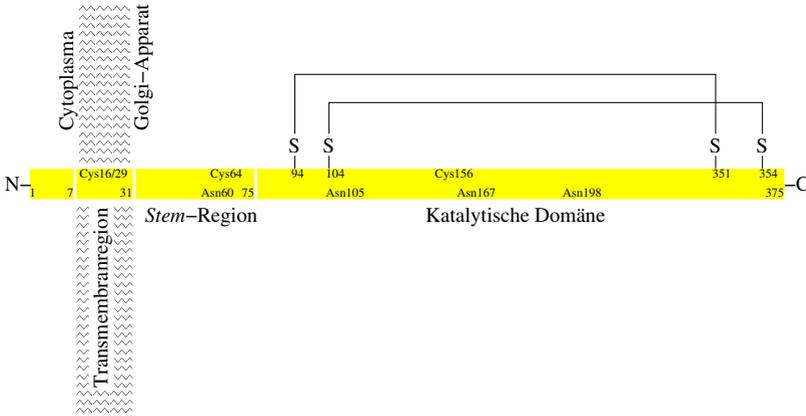


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der Fucosyltransferase V. Der Carboxy-Terminus beinhaltet die Akzeptorbindungsstellen und bildet das katalytische Zentrum. Zwischen der Transmembranregion und der katalytischen Domäne befindet sich eine *Stem*-Region, welche *in vivo* proteolytisch gespalten werden kann und so zur Sekretion löslicher Fucosyltransferase V führt. Die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cys94 und Cys351 sowie Cys104 und Cys354 wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zur FucT III postuliert (Holmes *et al.*, 2000). Gekennzeichnete Asparagine (Asn) sind putative N-Glycosylierungsstellen.

et al., 2001). Einige Fucosyltransferasen, so auch die Fucosyltransferase V, werden durch die Behandlung mit alkylierenden Reagenzien inaktiviert, was auf das Vorhandensein freier Cysteine im aktiven Zentrum hindeutet. Dabei ist interessant, daß durch die Anwesenheit von GDP-Fucose diese Inaktivierung ausbleibt und das Cystein im aktiven Zentrum geschützt ist (Holmes *et al.*, 1995).

Die sechs humanen α 1,3/4-Fucosyltransferasen besitzen zwischen zwei und fünf potentielle N-Glycosylierungsstellen. Der Umfang, in dem diese posttranslatorische Modifikation entsteht, ist bedeutend für die Aktivität der Enzyme. Beide Stellen der Fucosyltransferase III sind glycosyliert (Holmes *et al.*, 2000) und diese Modifikation ist essentiell für die Aktivität des Enzyms. Diese beiden Glycosylierungsstellen sind konserviert bei der Fucosyltransferase III, V und VI, jedoch haben die FucT V und VI noch zwei zusätzliche N-Glycosylierungsstellen, wobei die Glycosylierungsstelle Asn60 bei der FucT V nicht glycosyliert wird, wenn sie rekombinant in COS-Zellen exprimiert wird (Nguyen *et al.*, 1998). Bislang konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Aktivität direkt von der Glycosylierung des Enzyms abhängt (Christensen *et al.*, 2000a und Christensen *et al.*, 2000b) oder ob die Zuckerstrukturen ausschließlich für eine korrekte Faltung des Enzyms im endoplasmatischen

Reticulum verantwortlich sind (Morais *et al.*, 2003).

All diese Daten sind in der Lage, den Reaktionsmechanismus zu postulieren und einen Überblick über die Bedeutung einzelner Aminosäuren zu geben. Die Unterschiede in der Spezifität der Enzyme können so jedoch nur ansatzweise geklärt werden, so daß weitere strukturelle Daten, wie man sie aus der Röntgenstrukturanalyse gewinnen könnte, unbedingt notwendig sind.

1.3.9 Rekombinante Expression humaner α 1,3/4-Fucosyltransferasen

Die Gewinnung humaner α 1,3/4-Fucosyltransferasen aus natürlichen Quellen ist beschränkt durch die geringe Expressionsrate dieser Enzyme in den unterschiedlichen Geweben (Cameron *et al.*, 1995). Aus den Kulturüberständen einer humanen epidermoider Karzinoma-Zelllinie konnte jedoch eine lösliche, sekretierte Form einer α -3/4-Fucosyltransferase isoliert werden (Johnson *et al.*, 1993). Diese Fucosyltransferase entspricht in ihrer Spezifität und ihren Eigenschaften der Fucosyltransferase, die in kleinen Mengen für die enzymatische Synthese aus menschlicher Milch gereinigt werden kann (Vandenbroucke *et al.*, 1976 und Stangier *et al.*, 1997).

Unterschiedliche rekombinante Expressionssysteme wurden bis heute verwendet, um die humanen α 1,3/4-Fucosyltransferasen herzustellen. Für funktionelle, kinetische und zellbiologische Untersuchungen, wie z.B. der Sublokalisierung von Fucosyltransferasen im Golgi-Apparat, reichen in der Regel geringe Mengen an Protein aus (Grabenhorst und Conradt, 1999, Vo *et al.*, 1998 und Weston *et al.*, 1992a). Dabei kann je nach Fragestellung die Aminosäuresequenz des exprimierten Konstruktes von der ursprünglichen abweichen. So führt die Deletion der Transmembrandomäne und von Teilen der Stemregion zu einer löslichen Form der Fucosyltransferase (de Vries *et al.*, 1995). Diese lösliche Form entspricht weitestgehend der natürlichen löslichen Form von Fucosyltransferasen, die nach proteolytische Spaltung sezerniert werden (Mollicone *et al.*, 1990).

Strukturelle Untersuchungen erfordern jedoch Expressionssysteme, die das Zielprotein kostengünstig in großen Ausbeuten produzieren und eine einfache sowie verlustarme Reinigungsstrategie ermöglichen. Durch die Verwendung der Hefezelllinie *Pichia pastoris* konnte eine sekretierte Form der humanen Fucosyltransferase III mit einer Ausbeute von 30 mg/l Expressionsansatz produziert werden (Gallet *et al.*, 1998). Hefen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich posttranslationalen Modifikation sehr stark von menschlichen Zellen. Speziell die stark ausgeprägte N-Hyper-Glycosylierung kann dafür sorgen, daß das rekombinante Enzym sich stark von der nativen Form unterscheidet.

In den meisten Fällen werden $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen in Säugetierzellen hergestellt. Dieses Expressionssystem gewährleistet eine weitestgehend originäre posttranslationale Modifikation und stellt so eine hohe Vergleichbarkeit mit dem nativen Enzym sicher. Hinsichtlich der Ausbeuten an rekombinanten Fucosyltransferasen, die in der Regel bei 0,1–0,5 mg/l liegen (Costa *et al.*, 1997a, Weston *et al.*, 1992b, Christensen *et al.*, 2000a und Xu *et al.*, 1996), ist die Verwendung von mammalen Zellen jedoch als ungeeignet zu betrachten, größere Mengen an rekombinantem Enzym zu produzieren.

Insektenzellen haben in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle bei der Expression von $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen erlangt. Der Expressionsapparat der Insektenzellen ist vergleichsweise nahe mit den höherer Eukaryoten verwandt, ihre Glycosylierungsmuster unterscheiden sich allerdings in gewissen Maßen (O'Reilly *et al.*, 1994). Die Fucosyltransferase VII wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems als lösliches Protein-A-Fusionsprotein mit einer Ausbeute von 10 mg/l in *Spodoptera frugiperda*-Zellen (Sf9) exprimiert und über eine IgG-Sepharosesäule gereinigt (Shinkai *et al.*, 1997). Auch die Fucosyltransferase III war, jedoch ohne Fusionsanteil, so mit einer Ausbeute von 1 mg/l sowohl in Sf9- als auch in *Trichoplusia ni*-Zellen (*T. ni*) zugänglich (Morais *et al.*, 2001). Durch die Verwendung stabil transfizierter Sf9-Zellen steigerte sich die Ausbeute an rekombinanter Fucosyltransferase III auf 12 mg/l (Morais und Costa, 2003) und zeigt somit eine Methode auf, die es ermöglicht größere Mengen dieses Enzyms herzustellen.

Allgemein ist jedoch zu sagen, daß fast alle $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen bisher nur mit sehr kleinen Ausbeuten unter Verwendung von Säugetierzellen exprimiert wurden, und daß diese Methoden ungeeignet zur Produktion größerer Mengen von $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen sind, wie man sie für strukturelle Untersuchungen benötigt.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Expression großer Mengen humaner Fucosyltransferase V. Hierbei sollte geklärt werden, inwieweit prokaryotische Expressionssysteme in der Lage sind, funktionell aktives Protein zu produzieren, oder ob die Verwendung eukaryotischer Expressionssysteme notwendig ist. In Bezug auf die bisher äußerst geringen Ausbeuten bei der Expression der Fucosyltransferase V in Säugetierzellen, sollte eine auf eukaryotischen Zellen basierende Expression etabliert werden, die hinsichtlich der Expressionrate deutlich über den bisher erzielten Werten liegt.

Die auf diese Weise produzierte rekombinante Fucosyltransferase V sollte gereinigt und strukturell untersucht werden. Es war angestrebt, durch unter-

schiedliche biophysikalische Methoden tiefere Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau der Fucosyltransferase V zu erlangen.

Als drittes Ziel wurde die Entwicklung von Inhibitoren von der Fucosyltransferase V angestrebt. Dabei könnte mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie unterschiedliche vollständig degenerierte Peptid-Bibliotheken gegen die Fucosyltransferase V selektiert werden, um so Liganden zu erhalten, die den enzymatischen Umsatz dieses Proteins inhibieren. Langfristig sollten strukturelle Daten neben diesem kombinatorischen Ansatz ein rationales Design von spezifischen Inhibitoren ermöglichen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden bei Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Biomol Feinchemikalien (Hamburg), Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Millipore (Eschborn), Calbiochem (Schwalbach) und Peqlab (Erlangen) bezogen.

2.2 Enzyme, Proteine und Antikörper

Restriktionsenzyme, *Mung Bean* Nuclease, T4 Ligase, Alkalische Phosphatase (*Calf intestinal alkaline Phosphatase*) (CIAP) und dazugehörige Puffer wurden von MBI Fermentas (St. Leon Rot) und von NEB (Frankfurt) bezogen. *Thermus aquaticus* DNA Polymerase wurde von Eppendorf (Hamburg) oder von Roche (Mannheim) bezogen. Lysozym wurde ebenfalls von Roche gekauft. Fucosyltransferase V wurde in kleinen Mengen von Calbiochem (Schwalbach) bezogen. SDS-PAGE Proteinstandards (*broad range standard*, BRS) wurde von BioRad (München) bezogen. Antikörper wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.3 Affinitätsmatrices und Partikel

Ni-NTA-Agarose wurde von Qiagen (Hilden) bezogen. Dowex Harz wurde von BioRad (München), Protein A-Agarose wurde von Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, Kalifornien, USA) und GDP-Affigel von Jülich Fine Chemicals (Jülich) bezogen.

2.4 Bakterien und Hefestämme

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α (Promega, Mannheim) wurde für die Amplifikation von Plasmiden verwendet. Der Stamm BL21(DE3)pLysS wurde für die rekombinante Expression von Proteinen verwendet. Der Stamm ER2738 war Teil des Ph.D.-C7C *Phage Display Library Kit* von NEB (Frankfurt) und diente zur Vermehrung von Phagen (Tabelle 2.1).

Stamm	Genotyp
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (ϕ 801Z Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1
BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) gal λ (DE3) pLysS Cam ^r
ER2738	F' lacI ^q Δ (lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ zff::Tn10(Tet ^R)/fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB)5 ($r_k^- m_k^-$ McrBC ⁻)

Tabelle 2.1 Genotypen der verwendeten Bakterienstämme

2.5 Vektoren

- pMal-c2X** Der Vektor pMal-c2X wurde von NEB (Frankfurt) bezogen und diente zur Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli*.
- pET26DHFR-His** Der Vektor pET26DHFR-His stand im Arbeitskreis zur Verfügung und wurde für die Expression der DHFR in *E. coli* verwendet.
- pUC18/19** Die Vektoren pUC18/19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurde für die Klonierung verwendet.
- pEGFP-N1** Der Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg) wurde bei der Transfektion von mammalen Zelllinien verwendet, um die Transfektionseffizienz zu bestimmen.
- pVL1392** Der Vektor pVL1392 (Pharming, Karlsruhe) wurde als Baculovirus-Transfervektor für die Expression in Insektenzellen eingesetzt.
- pTriEx4-Neo** Der Vektor pTriEx4-Neo (Novagen, Schwalbach) wurde als Baculovirus-Transfervektor für die Expression in Insektenzellen eingesetzt.
- pIBV5-His** Der Vektor pIBV5-His (Invitrogen, Karlsruhe) diente zur stabilen Expression in Insektenzellen.

2.6 Zelllinien und Kultur

Sf900II-, Express Five-, DMEM-Medium, Penicillin G, Streptomycin und Trypsin/EDTA wurden von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Zellkulturschalen wurden bei Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (Nümbrecht) oder Corning (Wiesbaden) bezogen. Fötales Kälberserum wurde bei Biochrom (Berlin) gekauft.

Für die Expression wurden die mammalen Zelllinien CHO und HEK293 und die Insektenzelllinien Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) und BTI-TN-5B1-4 (HighFive™, *Trichoplusia ni*) verwendet.

2.7 Lösungen

BCIP-Stocklösung	0,5 % (W/V)	BCIP in DMF
Blockierungspuffer	0,1 M	NaHCO ₃ , pH 8,6
	5 mg/ml	BSA
BSATBS	3 %	BSA in TBS
CAPS-Puffer	20 mM	CAPS, pH 11,0
	10 % (v/v)	Methanol
Citratpuffer	50 mM	Zitronensäure, pH 4,0
Coomassie-Entfärber	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
Detektionspuffer (AP)	0,1 M	Tris-HCl, pH 9,5
	4 mM	MgCl ₂
Detektionspuffer	3,3 mg	ABTS
	15 ml	Citratpuffer
	26,5 µl	H ₂ O ₂

Material

Elutionspuffer	25 mM 3 mM	MES, pH 7,0 GDP
G418-Stocklösung	0,4 % (w/v) steril filtrieren	G418 in HEPES, 100 mM, pH 7,4 Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Iodid-Puffer	10 mM 1 mM 4 M	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA NaI
Loading Dye (6x)	20 % (w/v) 100 mM 0,025 % (w/v) 0,025 % (w/v)	Ficoll 400 EDTA Bromphenol-Blau Xylenxanol FF
Lösung I	50 mM 25 mM 10 mM autoklavieren	Glucose Tris-HCl, pH 8,0 EDTA Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Lösung II	0,2 M 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung III	3 M 11,5 % (v/v) autoklavieren	Kaliumacetat Essigsäure Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
NBT-Stocklösung	0,1 % (w/v)	NBT in 0,1 M Tris- HCl, pH 9,5
PBS	33 mM 15 mM 100 mM pH 7,2	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4 NaCl
PEG/NaCl	20 % (w/v) 2,5 M	Polyethylenglykol 8000 NaCl

Phenol/Chloroform	50 % (v/v) 50 % (v/v)	Phenol (Tris-gesättigt) Chloroform
Probenpuffer (4x)	250 mM 8 % (w/v) 40 % (v/v) 0,004 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glyzerin Bromphenolblau
Reaktionspuffer	50 % (v/v) 50 % (v/v)	DMSO PBS
Sammelgelpuffer (4x)	536 mM 4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
Sonication Puffer	100 mM 300 mM pH 8,0	Na ₂ HPO ₄ NaCl
TAE (50x)	2 M 50 mM pH 8,5	Tris EDTA
Tankpuffer (5x)	124 mM 0,96 M 0,5 % (w/v)	Tris, pH 8,3 Glycin SDS
TBS	50 mM 150 mM	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl
TBST	50 mM 150 mM 0,5 % (w/v)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl Tween 20
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
Tris-HCl + MgCl ₂	92,5 mM 4 mM	Tris-HCl, pH 9,5 MgCl ₂
Waschpuffer	25 mM	MES, pH 7,0

2.8 Medien

LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	ad 1 l ddH ₂ O	autoklavieren
LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefe-Extrakt
	10 g	Bacto-Trypton
	15 g	Agar
ad 1 l ddH ₂ O	autoklavieren	
TSS	85 % (v/v)	LB-Medium
	10 % (w/v)	PEG 8000
	5 % (v/v)	DMSO
	50 mM	MgCl ₂ , pH 6,2

2.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert (siehe Tabelle 2.2).

2.10 Bibliotheken und Phagen

In dieser Arbeit wurden Phagen aus dem Ph.D.7,- dem Ph.D.C7C- und dem Ph.D.12 *Phage Display Peptide Library Kit* NEB (Frankfurt) verwendet.

Name	Sequenz 5'-3'	Schnittstellen/ Mutationen
t19a	CAA TGG GTC CCG CAG CCA GGA CAG CAT G	T190A
t19a antisense	CAT GCT GTC CTG GCT GCG GGA CCC ATT G	T190A
t295a	CCC CCA GCA ACA GCC GGC ACC TGG	T703A
t295a antisense	CCA GGT GCC GGC TGT TGC TGG GG	T703A
β -TraceFucTV	CGG GAT CCC GCC ATG GCT ACT CAT CAC ACG CTG TGG ATG GGA CTG GCC CTG CTG GGG GTG CTG GGC GAC CTG CAG GCA GCA GCT CCC AAT GGG TCC CGC TGC	BamHI, NcoI
pFucTVFwGen	CCC AAG CTT ATG GAT CCC CTG GGC CCA GCC AAG	Hind III
pFucTVRevGen	CCG GAA TTC TCA GGT GAA CCA AGC CGC TAT GCT	EcoRI
pmalfw	CGG AAT TCG CTC CCA ATG GGT CCC GCT GCC AG	EcoRI
pmalrev	CCA AGC TTT CAG GTG AAC CAA GCC GCT ATG CT	HindIII
FucTVBamHIfw	CGG GGA TTC CTC CCA ATG GGT CCC GCT GCC AG	BamHI
FucTVPstIrev	CCA AGC TCT CAG GTG AAC CAA GTG GCT ATG CT	PstI
M13	GTA AAA CGA CGG CCA GTG CCA A	Sequenzierprimer
M13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG A	Sequenzierprimer
pIBseq	CGC AAC GAT CTG GTA AAC AC	Sequenzierprimer
pIBseqrev	GAC AAT ACA AAC TAA GAT TTA GTC AG	Sequenzierprimer
-96Primer	GCC CTC ATA GTT AGC GTA ACG	g3 Sequenzierprimer

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. LB Medium (3 ml) mit Ampicilin (100 µg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Davon wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4 min, 20.000 xg, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen und die sedimentierten Zellen in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wurde wiederum mehrfach invertiert, für 5 min bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (5 min, 20.000 xg, 4 °C). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA anschließend durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 xg wurde das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl TE aufgenommen und mit 0,5 µl RNase (10 mg/ml) versetzt.

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit käuflichen Kits

Plasmid-DNA für Klonierungen, Transfektionen oder Sequenzierungen wurde mittels des E.Z.N.A. Plasmid Minipräpp II Kits (Peqlab, Erlangen) gereinigt. Die Präparation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.1.3 Quantifizierung von DNA

In einer Quarzküvette wurden 100 µl DNA-Lösung bei 260/280 nm im Photometer (Ultrospec 3000-Photometer, Amersham Biosciences, Freiburg) vermessen. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260 nm dem empirischen

Wert von 50 μg DNA/ml. Reine DNA sollte ein Verhältnis der $\text{OD}_{260/280}$ von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen, die zwischen bekannten Sequenzen liegen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Zwei zu den bekannten Sequenzen komplementäre DNA-Fragmente dienen als Primer. Die Synthese der DNA erfolgte durch die Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf PCR Readymix), eine thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Ein 50 μl PCR-Ansatz setzte sich, wie in Tabelle 3.1 gezeigt, zusammen.

1–5 μl	Template
1–10 μl	Sense-Oligonukleotid (100 μM)
1–10 μl	Antisense-Oligonukleotid (100 μM)
20 μl	2,5x PCR Fertigmix mit dNTPs, Puffer und Polymerase (Eppendorf)

Tabelle 3.1 PCR-Ansatz.

Das nachfolgende Programm (siehe Tabelle 3.2) wurde im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Charakterisierung des Amplifikats erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Primärdenaturierung	30 s–1 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Hybridisierung	1–2 min	45 °C–67 °C
4. Elongation	1–2 min	72 °C
25–35 Zyklen (Schritt 2–4)		
5. Terminale Elongation	5–10 min	72 °C

Tabelle 3.2 PCR-Programm.

3.1.5 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung endständiger Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten wurde zum Restriktionsansatz 1 μl CIAP (MBI Fermentas, St. Leon Rot) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde

erneut 1 μ l CIAP zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 6x Loading Dye oder durch Hitzedeaktivierung gestoppt.

3.1.6 Alkoholpräzipitation der DNA

Der Restriktionsansatz wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und mit dem 2,5-fachem Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 min, 20.000 xg, 4 °C), der Überstand abgesogen und das Pellet mit 500 μ l eiskaltem 70 %igem Ethanol versetzt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (10 min, 20.000 xg, 4 °C), der Überstand abgesogen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in dem gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Restriktionsanalyse, Analyse von PCR-Ansätzen und zur präparativen Isolation von DNA-Fragmenten genutzt. Es wurden 1 %ige Agarosegele (Qualax Gold Agarose, AGS Heidelberg) zur Auftrennung von Fragmenten von 500 bp bis 12000 bp Größe sowie 2 %ige Agarose-Gele zur Auftrennung von Fragmenten unter 500 bp verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und mit 5 μ l Ethidiumbromid (1 μ g/ml) versetzt. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Als Standard wurde λ -DNA/Eco130I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei 90–130 V in einer Elektrophoresekammer in TAE-Puffer aufgetrennt, mittels des Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und mit einem Videosystem (Intas, Göttingen) dokumentiert.

3.1.8 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QiaexII Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

3.1.9 Ligation

Der für die Ligation verwendete Vektor wurde im Verhältnis 1:1 bis 1:5 zum Insert eingesetzt, wobei das Verhältnis im Agarose-Gel abgeschätzt wurde. Ein Ligationsansatz setzt sich wie in Tabelle 3.3 gezeigt zusammen.

X μ l	Vektor
Y μ l	Insert
1 μ l	T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
2 μ l	10x Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
	ad 20 μ l mit ddH ₂ O

Tabelle 3.3 Ligations-Ansatz

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C, anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Reaktion (65 °C, 15 min).

3.1.10 Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach einer Methode von Chung (Chung *et al.*, 1989). LB-Medium (3 ml) wurde mit DH5 α -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Hier von wurde 1 ml abgenommen und zu 100 ml LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde unter o.g. Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt, in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation (1 °C, 2.000 xg, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in je 5 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert (300 μ l) und mit Hife von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.1.11 Transformation

Kompetente DH5 α -Zellen wurden 30 min auf Eis aufgetaut und 100 μ l davon mit 10 μ l Ligationsansatz oder 0,5 μ l (ca. 1 ng) präpariertem Plasmid vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend 90 s auf 42 °C erhitzt und 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 1 ml LB-Medium gegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert, um danach auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen zu werden.

3.1.12 Lagerung von *E. coli* Klonen

E. coli Klone waren für einen Monat auf Agarplatten haltbar, wenn diese mit Parafilm verschlossen und invertiert bei 4 °C aufbewahrt wurden. Zur Langzeitlagerung wurde 1 ml einer frischen *E. coli*-Kultur in der logarithmischen

Wachstumsphase mit 200 μl 80%igem Glycerol versetzt und in einem Kryoröhrchen mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.13 DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde über das E.Z.N.A. Plasmid Minipräp II Kit (Peqlab, Erlangen) gereinigt und photometrisch quantifiziert. Etwa 600–800 ng DNA, ca. 10 pmol des entsprechenden Oligonukleotids, 6 μl Half Term-Puffer und 2 μl Big Dye Terminator Ready Reaktion Mix wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit ddH_2O auf 20 μl Volumen aufgefüllt. Die für die Sequenzierung verwendeten Reagenzien sind Bestandteile des Big Dye Terminator Ready Reaktion Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Mit dem Ansatz wurde das folgende Programm im Termocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt (Tabelle 3.4).

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	30 s	96°C
2. Hybridisierung	5 s	48°C – 50°C
3. Elongation	4 min	60°C
25 Zyklen (Schritte 1–3)		
4. Terminale Elongation	5–10 min	72°C

Tabelle 3.4 Sequenzierprogramm

Anschließend wurde die DNA mit 8 μl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 300 μl 96%igem Ethanol gefällt (30 min, 4°C) und zentrifugiert (30 min, 20.000 xg, 4°C). Nach Zugabe von 500 μl 70 %igem Ethanol wurde zentrifugiert (15 min, 20.000 xg, 4°C), der Überstand abgesogen und die DNA für 1 h an der Luft getrocknet. Die Auftrennung und Auswertung der sequenzierten DNA erfolgte durch das Institut für Zellbiochemie am Universitätskrankenhaus Eppendorf, Arbeitskreis Richter.

3.1.14 Ortsspezifische Mutagenese

Für eine ortsspezifische Mutagenese wurde die *QuickChange*-Methode (Wang und Malcolm, 1999) angewandt, bei der zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet werden, in deren Mitte der gewünschte Basenaustausch kodiert ist. Mit diesen Oligonukleotiden wurde das cDNA tragende Plasmid amplifiziert.

Die methylierte Template-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut. Nicht-methylierte, durch *Pfu* Polymerase amplifizierte DNA wird nicht verdaut und anschließend gefällt. Es erfolgte die Transformation in kompetente DH5 α -Zellen.

3.2 Phagentechniken

3.2.1 Phagen Display

Das Phagen Display-System ist ein Selektionsprozess zur Identifikation von Bindungs-Partnern. In einem zyklischen Prozeß aus Transkription/Translation und Affinitäts-Selektion werden Bindungs-Partner angereichert. Durch den Bakteriophagen können Peptide auf der Oberfläche als Fusionspartner des Hüllproteins GenIII exprimiert werden und sind direkt mit der genetischen Information verknüpft. Durch eine nachfolgende Infektion von *E. coli* mit dem filamentösen Bakteriophagen M13 kann die genetische Information gewonnen werden.

3.2.2 Selektion der Peptidbibliothek

3.2.3 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 10 ml LB-Medium mit ER2738 *E. coli* Zellen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Es wurden Verdünnungen des Phageneluates in LB-Medium von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ vorbereitet. Von jeder Verdünnung wurden 10 μ l mit je 200 μ l der gewachsenen Zellsuspension versetzt und ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu 3 ml vorgewärmtem Top-Agar gegeben und auf einer LB-IPTG-X-Gal-Platte verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die blaugefärbten Plaques wurden ausgezählt und der Titer errechnet. Zur Titerbestimmung der amplifizierten Phagen wurde analog verfahren; es wurden jedoch Verdünnungen von 10⁻⁵ bis 10⁻¹¹ angesetzt.

3.2.4 Amplifikation selektierter Phagen

Nach erfolgreicher Affinitäts-Selektion der Phagen müssen diese in ER2738 *E. coli* Zellen für weitere Runden der Selektion vermehrt werden. Es wurden 20 ml LB-Medium mit ER2738 *E. coli* Zellen angeimpft und bei 37 °C und

220 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde das Phagen-Eluat zugesetzt und die Kultur für weitere 4,5 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 2800 xg und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit 1/6 Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die so gefällten Phagen wurden zentrifugiert (4 °C, 2800 rpm, 30 min), in 1 ml TBS resuspendiert und 5 min bei 4 °C und 10000 xg zentrifugiert, um restliche Zellen abzutrennen. Die Phagen wurden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/6 Volumen PEG/NaCl-Lösung für 1–2 h bei 4 °C gefällt. Nachfolgend wurde für 10 min bei 4 °C und 10000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Phagen in 200 μ l TBS aufgenommen.

3.2.5 Phagen-DNA-Präparation zur Sequenzierung

Zur Analyse der Klone, die in den dritten Selektionsrunden isoliert wurden, wurde die Sequenz ermittelt. Dafür wurden zuerst einzelne Klone amplifiziert, um dann aus den Phagen die DNA zu isolieren. Es wurden Übernachtskulturen von ER2738 *E. coli* Zellen in LB-Tetracyclin-Medium angesetzt und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Kultur 1:100 (100 μ l auf 10 ml) in LB-Medium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde jeweils 1 ml in mehrere Rundbodenröhrchen überführt. Anschließend wurde eine repräsentative Anzahl der positiven Klonen mit einer Pipettenspitze gepickt, diese in die vorbereiteten Rundbodenröhrchen gegeben und bei 37 °C für 4,5–5 h im Schüttler inkubiert. Die Kulturen wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 5000 xg zentrifugiert. 500 μ l des Phagen enthaltenen Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 μ l PEG/NaCl-Lösung versetzt. Nach Inversion folgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Es wurde 10 min bei 20800 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ l Iodid-Puffer resuspendiert, mit 250 μ l 96 % Ethanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 20800 xg für 10 min zentrifugiert und das Pellet mit 250 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 30 μ l ddH₂O aufgenommen.

3.2.6 Polyklonale ELISA-Analyse

Um den Verlauf der Selektion auf eine mögliche Anreicherung spezifischer Phagen hin zu verfolgen, wurde die Reaktivität der amplifizierten Phagen charakterisiert. Dazu wurde das Zielmolekül (50–100 μ g/ml) über Nacht bei

4 °C in den Vertiefungen einer ELISA-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreifach mit TBS gewaschen und mit Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation der Phagen (1:10 verdünnt in Blockierungspuffer) erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h; nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde mit 100 µl eines anti-M13-POD-Konjugates (1:5.000 in Blockierungspuffer) für 1 h inkubiert. Nach drei- bis fünffachem Waschen mit TBST und TBS wurde die Farbentwicklung mit Detektion für POD durchgeführt und bei 405 nm vermessen.

3.2.7 Monoklonale ELISA-Analyse

Zur Charakterisierung der Reaktivität singulärer Phagen-Klone wurde analog zu der polyklonalen Analyse verfahren. Nach der dritten Selektionsrunde wurden ER2738 *E. coli*-Zellen in einem Kulturvolumen von 3 ml bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterienzellen wurden mit einzelnen Phagenkolonien angeimpft und für 4,5 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Aus dem Überstand dieser Kulturen wurden die Phagen mit 1/6 Volumen PEG/NaCl-Lösung präzipitiert und nach Zentrifugation (10.000 xg, 10 min, 4 °C) in 100 µl TBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und für die ELISA-Analyse eingesetzt.

3.2.8 Selektion

Für die Selektion wurde in den ersten beiden Selektionsrunden auf die Verwendung von Immuno-Röhrchen zurückgegriffen, die zur Belegung mit 1 ml einer Streptavidin-haltigen PBS-Lösung (100 µg/ml) über Nacht bei 4 °C auf dem Rollbrett inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurde das Immunröhrchen entleert, dreifach mit TBS gewaschen, komplett mit Blockierungspuffer befüllt und für einen Zeitraum von 2 h bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 4–8 µg biotinyliertes Zielprotein mit 2×10^{11} Phagen der Heptapeptid-Bibliothek (10 µl) in einem Volumen von 200 µl für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 1 ml mit Blockierungspuffer aufgefüllt, in das entleerte Immuno-Röhrchen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden mit dem Überstand verworfen und das Röhrchen auf sauberem Papier ausgeschlagen. Im Anschluß wurde zehnfach mit TBST gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden durch Zugabe von 1 ml 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für exakt acht Minuten auf dem Rollbrett bei Raumtemperatur eluiert. Anschließend wurde zur Neutralisation 150 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,1, in das Polystyrol-Gefäß gegeben, invertiert und das Eluat in ein Reaktionsgefäß überführt. 10 µl des

Eluats wurden anschließend zur Bestimmung des Titers eingesetzt, der Rest zur Amplifikation eingesetzt.

In der dritten Selektionsrunde wurde das Zielprotein direkt chemisch an eine Epoxy-funktionalisierte Polystyroloberfläche gebunden. Hierzu wurde die Vertiefung einer solche ELISA-Platte mit Proteinlösung einer Konzentration von 50 µg/ml über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Daraufhin wurde die Proteinlösung entfernt und mit 200 µl Blockierungspuffer für 2 h bei RT inkubiert. 2×10^{11} Phagen der Heptapeptid-Bibliothek (10 µl) in einem Volumen von 200 µl Blockierungspuffer wurde in die Vertiefung pipetiert und bei RT auf einem Schüttelbrett inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden mit dem Überstand verworfen und das Röhrchen auf sauberem Papier ausgeschlagen. Im Anschluß wurde zehnmal mit TBST gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden mit 1 ml 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für exakt acht Minuten eluiert. Anschließend wurde zur Neutralisation 150 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,1, in das Polystyrol-Gefäß gegeben, invertiert und das Eluat in ein Reaktionsgefäß überführt. 10 µl des Eluats wurden anschließend zur Bestimmung des Titers, der Rest zur Amplifikation eingesetzt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde in einem diskontinuierlichen System nach (Laemmli, 1970) mit einem Minigel-Gerät (2050 Midget, Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt.

3.3.2 Coomassie-Färbung von Proteinbanden

Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für 30 min in einer filtrierten Lösung von 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig gefärbt. Als Entfärber diente eine Lösung aus 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig.

3.3.3 Silberfärbung von Proteinbanden

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 1 h in 30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Eisessig fixiert und anschließend für 1–12 h in eine Inkubationslösung aus 500 mM Natriumacetat, 14 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 25 % (v/v)

Ethanol und 0,5% (v/v) Glutaraldehyd (25%ig) eingelegt. Nach dreimal 10 min Waschen mit Wasser wurden die Gele 30 min in 6 mM AgNO₃, 0,06% (v/v) Formaldehyd (37%ig) gefärbt, kurz mit Wasser gewaschen und anschließend in 263 mM Na₂CO₃, 0,06% (v/v) Formaldehyd (37%ig) entwickelt. Gestoppt wurde die Entwicklung durch Überführen der Gele in 50 mM EDTA-Lösung.

3.3.4 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien in einem SE 1200 Easy Breeze Air Gel Dryer (Hoefer Scientific Instruments, USA) getrocknet.

3.3.5 Western Blot

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf Membranen wurde in einer TE Series Transfer Elektrophoresis Einheit (Hoefer Scientific Instruments, USA) durchgeführt. Als Membran wurde eine Immobilon-P PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) verwendet, die kurz in Methanol, für 10 min in Wasser und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Filterpapiere, Faserschwämme und SDS-Polyacrylamidgele wurden nach beendeter Elektrophorese für 5 min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend zu einem Sandwich aus Faserschwamm, Polyacrylamidgel, Filterpapier und Transfermembran luftblasenfrei in einem Gelhalter gestapelt. Der Transfer erfolgte unter Eiskühlung in Transferpuffer bei 50 V und 180 mA für 1,5 h.

3.3.6 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der BCA-Methode durchgeführt (Smith *et al.*, 1985). Als Standardlösungen dienten Verdünnungen von BSA, wobei alle Messungen in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

3.3.7 Zellaufschluß von *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Zur Aufreinigung der cytoplasmatisch rekombinant exprimierten Proteine wurden die *E. coli* Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Bakterienkulturen nach Beendigung der Expression zunächst bei 1700 xg für 15 min (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in Abhängigkeit von der nachfolgenden Säulenchromatographie in dem zugehörigen Puffer resuspendiert und vereinigt. Bei 12000 microns wurde die Zellsuspension 15-mal für

30 s auf Eis sonifiziert (Soniprep 150, MSE Hamburg). Der Rohextrakt wurde anschließend bei 20800 xg für 1 h (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, durch einen Spritzenfilter (0,22 µm, Typ GS, Millipore, Eschborn) sterilfiltriert und bei 4 °C bis zur weiteren säulenchromatographischen Reinigung gelagert.

3.3.8 Säulenchromatographische Verfahren

Alle Säulenchromatographien, die zur Reinigung von rekombinanten Proteinen eingesetzt wurden, sind bei 4 °C automatisiert an einer FPLC-Anlage (*ÄKTA purifier*, Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt worden. Diese Anlage war mit einem Fraktionssammler (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verbunden. Die FPLC-Anlage und die entsprechende Chromatographie-Säule wurden zunächst mit ddH₂O und anschließend mit dem verwendeten Laufpuffer gespült. Alle Puffer und proteinhaltigen Fraktionen wurden vor der Benutzung durch einen 0,22 µm Filter (Typ GS, Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Alle Meßdaten, wie z.B. Absorption bei 280 nm und Leitfähigkeit der Lösung, wurden während des gesamten Laufs mit einem Computer aufgezeichnet. In dieser Arbeit wurden die Methoden der Ionenaustausch- sowie Affinitätschromatographie angewendet.

3.3.9 IMAC (*Immobilized metallion affinity chromatography*)

Rekombinante „His-Tag“ Fusionsproteine wurden über eine Ni-NTA-Matrix gereinigt. Hierzu wurde das Zellysat auf eine Ni-NTA-Säule (1 ml Säulenvolumen) aufgetragen und die Säule mit 4 ml *Sonication* Puffer gespült. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 4 ml *Sonication* Puffer, dem 20 mM Imidazol zugesetzt wurden, von der Säule gewaschen, um anschließend mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM die spezifisch gebundenen „His-Tag“ Fusionsproteine zu eluieren.

3.3.10 Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate

Unlösliche Proteinaggregate können in denaturierenden Puffern in Lösung gebracht werden, und durch schnelle Verdünnung in eine lösliche native Struktur rückgefaltet werden. Hierbei spielt die Zusammensetzung des Puffers, in das die Proteinlösung zum Verdünnen gegeben wird eine entscheidende Rolle.

Zum Evaluieren der besten Rückfaltungsbedingungen wurde das *FoldIt*-Kit (Hamton-Research) verwendet.

Denaturierte, aus Einschlußkörperchen gereinigte Fucosyltransferase V (13 mg/ml, in 6 M GuHCl) wurde in 16 unterschiedliche Rückfaltungspuffer verdünnt Tabelle 3.5. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert, gegen 5 l PBS dialysiert, und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (22.000 xg, 60 min, 4 °C). Die unterschiedlichen Rückfaltungspuffer hatten eine in Tabelle 3.6 aufgelistete Zusammensetzung.

Foldit Nr.	0,1 M DTT	30 mM Lauryl Maltosid	100 mM GSH	10 mM GSSG	Protein	Protein Konz.
1	10 µl	–	–	–	7,5 µl	0,1 mg/ml
2	–	10 µl	10 µl	10 µl	7,5 µl	0,1 mg/ml
3	–	–	10 µl	10 µl	7,5 µl	0,1 mg/ml
4	10 µl	10 µl	–	–	7,5 µl	0,1 mg/ml
5	–	–	10 µl	10 µl	50 µl	0,65 mg/ml
6	10 µl	10 µl	–	–	50 µl	0,65 mg/ml
7	10 µl	–	–	–	50 µl	0,65 mg/ml
8	–	10 µl	10 µl	10 µl	50 µl	0,65 mg/ml
9	10 µl	–	–	–	7,5 µl	0,1 mg/ml
10	–	10 µl	10 µl	10 µl	7,5 µl	0,1 mg/ml
11	–	–	10 µl	10 µl	7,5 µl	0,1 mg/ml
12	10 µl	10 µl	–	–	7,5 µl	0,1 mg/ml
13	–	–	–	–	50 µl	0,65 mg/ml
14	10 µl	10 µl	–	–	50 µl	0,65 mg/ml
15	10 µl	–	–	–	50 µl	0,65 mg/ml
16	–	10 µl	10 µl	10 µl	50 µl	0,65 mg/ml

Tabelle 3.5 Pipetierschema zur Evaluierung optimaler Rückfaltungsbedingungen: Zu 950 µl Rückfaltungsreagenz wurden unterschiedliche Additive gegeben und anschließend mit Fucosyltransferase V-Lösung (13 mg/ml) versetzt. Die unterschiedlichen Rückfaltungspuffer hatten eine in Tabelle 3.6 aufgelistete Zusammensetzung.

3.3.11 Isolierung von rekombinanter Fucosyltransferase V

Die Reinigung der Fucosyltransferase V erfolgte in Anlehnung an eine Methode von (Costa *et al.*, 1997a). Bei dieser Arbeit wurde die Reinigung mit einer GDP-Affinitätschromatographie und anschließender Kationentauscherchromatographie durchgeführt. Fucosyltransferase V enthaltender Zellkulturüberstand (250 ml) wurde auf eine GDP-Affinitätssäule (10 × 100 mm²) aufgetragen. Die Säule wurde mit vierfachem Säulenvolumen Waschpuffer gewa-

Nr.	Zusammensetzung
1	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 20 mM GuHCl, 1,1 mM EDTA, pH 6,8
2	1,1 mM NaCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 12,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
3	1,1 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 12 mM 1,1 mM EDTA, pH 6,8
4	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , pH 8,3
5	1,1 mM NaCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 6,8
6	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 20 mM GuHCl, 1,1 mM EDTA, pH 8,3
7	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
8	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
9	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
10	1,1 mM NaCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
11	1,1 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 550 mM GuHCl, 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
12	10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 20 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
13	10,56 mM NaCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
14	1,1 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 20 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , pH 6,8
15	10,56 mM NaCl, 550 mM GuHCl, 12 mM MgCl ₂ , 11,2 mM CaCl ₂ , pH 8,3
16	1,1 mM NaCl, 0,44 mM KCl, 20 mM GuHCl, 1,1 mM EDTA, pH 6,8

Tabelle 3.6 Zusammensetzung der unterschiedlichen Rückfaltungspuffer

schen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit vierfachem Säulenvolumen Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot auf Proteingehalt überprüft. Fucosyltransferase V enthaltene Fraktionen wurden vereinigt, ultrafiltriert und mit Salzsäure auf pH 6,0 eingestellt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf eine MonoS Kationentau- schersäule gegeben. Nach Elution ungebundener Proteine wurde ein linearer Gradient von 0–1 M NaCl angelegt. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen

wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt und die proteinhaltigen Proben mittels SDS-PAGE und Aktivitätstest auf ihren Fucosyltransferase-Gehalt überprüft.

3.3.12 FCS Messungen

Mit Hilfe der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) können kinetische Daten von Protein-Ligand-Wechselwirkungen bestimmt werden. Die Bestimmung dieser Daten beruht auf der Tatsache, daß schwere Moleküle (in diesem Falle Protein-Ligand-Komplex) in Lösungen langsamer diffundieren (Brownische Bewegung) als kleine Moleküle (der Ligand alleine). Die Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit kann zur Berechnung von Bindungskonstanten benutzt werden.

Durch die Markierung des Liganden mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann dieser mit Hilfe von Laseroptiken beobachtet werden. Dabei wird ein sogenanntes confokales Volumen (1 fl) fokussiert und im Nanosekundentakt die Anwesenheit oder Abwesenheit des Fluoreszenzmarkers bestimmt. Je häufiger dieser Farbstoff detektiert werden kann, desto größer ist die Diffusionsgeschwindigkeit. Durch Zugabe des Bindungspartners, der in der Regel mindestens die 8-fache Masse haben sollte, ändert sich durch die Bindung an den Liganden die Diffusionsgeschwindigkeit. Konzentrationsabhängige Messungen erlauben dann die Bestimmung von der Bindungskonstante.

FCS-Messungen wurden bei der Firma Carl-Zeiss im Rahmen einer Geräte-Vorstellung in Jena durchgeführt. Verwendet wurde das Gerät LSM 510 META. Das FITC-markierte Peptid wurde bei einer Konzentration von 22,5 nM im Gerät vermessen und die Änderung der Diffusion durch Zugabe von 220 nM FucT V beobachtet.

3.3.13 Test zur Bestimmung der Fucosyltransferase V-Aktivität

Die Fucosyltransferase V katalysiert die Transglycosylierung der Fucose vom Donornukleotidzucker GDP-Fucose auf den Akzeptorzucker N-Acetyl-Lactosamin. Die Reaktion kann durch Verwendung ^{14}C -markierter GDP-Fucose und durch Trennung der Produkte von dem Edukt GDP-Fucose durch Messung der Radioaktivität beobachtet werden. Dabei wird ausgenutzt, daß durch die Übertragung der ^{14}C -markierten Fucose von dem doppelt negativ geladenen Edukt GDP-Fucose auf den Akzeptorzucker ein ungeladenes ^{14}C -markiertes Produkt (Le^x) entsteht, daß sich über eine Anionentauscher-Chromatographie

abtrennen und in einem Flüssigscintilationszähler vermessen läßt (Weston *et al.*, 1992a). Die Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

Ansatz	Reagenz
Kontrolle	10 mM MgCl ₂ 25 mM Cacodylat pH 6,2 10 mM LacNAc 1,25 mM GDP-Fucose 0,925 kBq ¹⁴ C-GDP-Fucose (11,1 GBq/mmol) <i>ad</i> 50 µl ddH ₂ O
Probe	10 mM MgCl ₂ 25 mM Cacodylat pH 6,2 10 mM LacNAc 1,25 mM GDP-Fucose 0,925 kBq ¹⁴ C-GDP-Fucose (11,1 GBq/mmol) 5 µl Probe <i>ad</i> 50 µl ddH ₂ O

Tabelle 3.7 Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze des FucT V-Aktivitätstests.

Alle Komponenten der Kontroll- und Reaktionsansätze wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und üblicherweise 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl eiskaltem ddH₂O gestoppt. Zur Abtrennung des ¹⁴C-markiertem Produktes wurde der Reaktionsansatz über eine Anionentauschersäule gereinigt. Zur Aktivierung der Ionentauschermatrix wurde pro Ansatz 1 g Anionentauscherharz (Dowex-Harz, Bio-Rad) mit je 4 ml 0,1 M HCl und dann mit 4 ml 1 M NaCl gewaschen. Die so vorbereitete Matrix wurde in eine 12 ml Polyethylensäule (Varian, Darmstadt) gefüllt und drei mal mit 4 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz (450 µl) auf die Säule gegeben, das Produkt zwei mal mit 750 µl ddH₂O eluiert, in einem 5 ml Scintillationsröhrchen aufgefangen und mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Probe wurde in einem Tri-Carb 2500 TR Flüssigscintilationszähler (Packard, USA) vermessen und die Zerfälle pro Minute (dpm) bestimmt. Quantitativer Umsatz resultiert in einer Aktivität von 0,925 kBq (55.500 dpm). Eine *Unit* ist definiert als die Menge Enzym, die in 1 min bei 37 °C 1 µmol Fucose von GDP-Fucose auf N-Acetyllactosamin transferiert.

3.3.14 Test zur Bestimmung der DHFR-Aktivität

Die DHFR katalysiert die Reduktion von FH_2 durch NADPH zu FH_4 und NADP^+ . Diese Aktivität kann photometrisch über den NADPH-Verbrauch im Testansatz durch Messung der spezifischen Absorption bei 340 nm untersucht werden, die bei DHFR-Aktivität stetig abnimmt (Hillcoat *et al.*, 1967). Die Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.8 angegeben.

Ansatz	Reagenz
Kontrolle	330 μl Test-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5) 500 μl ddH ₂ O 70 μl NADPH (100 μM) in Test-Puffer 100 μl FH ₂ (75 μM) in Test-Puffer
Probe	330 μl Test-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5) 400 μl ddH ₂ O 100 μl Probe 70 μl NADPH (100 μM) in Test-Puffer 100 μl FH ₂ (75 μM) in Test-Puffer

Tabelle 3.8 Zusammensetzung der Kontroll- und Reaktionsansätze des DHFR-Aktivitätstests.

Alle Komponenten der Kontroll- und Reaktionsansätze, mit Ausnahme von FH_2 , wurden in eine Einmalküvette gegeben. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert, um den unspezifischen NADPH-Verbrauch zu minimieren. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von FH_2 gestartet und die spezifische Absorption bei 340 nm vermessen ($E_{t=0}$). Als Nullwert diente Test-Puffer, der mit ddH₂O im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde erneut die Absorption gemessen ($E_{t=30}$). Zur Berechnung der Probenaktivität wurde zunächst die Differenz (ΔE) der Absorption zum Zeitpunkt $t = 0$ min ($E_{t=0}$) und $t = 30$ min ($E_{t=30}$) gebildet. Von diesen Werten wurde der entsprechende Wert der Kontrolle abgezogen. Die so korrigierten Absorptionsdifferenzen (E_{korrt}) wurden mit Hilfe der Standarddefinition in Einheiten (*Units*) umgerechnet. Es ist definiert, daß eine *Units* DHFR-Aktivität der Enzymmenge entspricht, die unter Standardbedingungen 1 mmol FH_2 pro Minute in FH_4 umwandelt.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Präparation von Immunisierungsproben

Zur Immunisierung wurde die Fucosyltransferase nach der IMAC Aufreinigung über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel weiter gereinigt. Dazu wurden 500 µl proteinhaltige Lösung mit 4x reduzierendem Probenpuffer für 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt und über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (1,5 mm Dicke) bei 90 V unter Wasserkühlung aufgetrennt. Nach der Anfärbung mit Coomassie wurde die Proteinbande, in der sich die rekombinante Fucosyltransferase V befand, aus dem Gel ausgeschnitten, getrocknet und mit einem Mörser zu feinem Pulver zerstoßen.

3.4.2 Immunisierung

Die Fucosyltransferase (ca. 1 mg) enthaltende Pulver wurde mit 2 ml komplettem Freudschen Adjuvants emulgiert. Die Emulsion wurde aufgeteilt und zwei 3 Monate alten Kaninchen Subcutan injiziert. Vier Wochen nach der Primäinjektion wurde die erste Boostinjektion durchgeführt. Hierbei wurde wie oben vorgegangen, mit dem Unterschied, daß inkomplettes Freudsches Adjuvants verwendet wurde. Nach jeweils 6 Wochen wurde eine zweite und eine dritte Boostinjektion analog der ersten durchgeführt.

3.4.3 Gewinnung von Antiseren

Antiseren wurden 10–17 Tage nach jeder Boostinjektion gewonnen. Hierbei wurden je einige ml Blut aus der äußeren Ohrvene mit einer Kanüle gesammelt. Nach der letzten Boostinjektion wurde das gesamte Blut der Kaninchen durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und das Serum von den geronnenen Bestandteilen durch Zentrifugation (10 min, 1.000 xg, 4 °C) abgetrennt.

3.4.4 Anreicherung von Antikörpern aus Antiseren

Protein A ist ein bakterielles Protein, das sich durch hohe Affinität zu Domänen von Immunglobulinen auszeichnet. Gekoppelt an Agarose ist es zur Reinigung von Antikörpern einsetzbar. Zur Reinigung der Immunglobuline aus Kaninchenantiseren wurden 5–10 ml Antiserum auf eine Protein-A-Agarose

Säule gegeben. Nicht gebundene Proteine wurden mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 herausgewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Zitronensäurepuffer pH 3,0. Der pH-Wert der Elutionsfraktionen wurde sofort durch Zugabe von 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert.

3.4.5 Immuno-Blot

Der Immuno-Blot diente zum spezifischen Nachweis von Antigenen nach elektrophoretischem Transfer auf Membranen. Die Membran wurde 15 min in TBS gewaschen, anschließend für 2 h in Blockierlösung inkubiert und wiederum zweimal für 5 min in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antiserum (1:500–1:1.000 verdünnt) in BSATBS für 3–12 h inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen für 5 min in TBS wurde mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten sekundären Antikörper (1:10.000 verdünnt) in BSATBS für 2–4 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min in TBS, 5 min in 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 gewaschen und in 25 ml NBT/BCIP Färbelösung unter Lichtausschluß gefärbt. Nach Waschen in Wasser wurde die Membran schließlich an der Luft getrocknet.

3.5 Baculovirus-Expressionssystem

Sämtliche Arbeiten mit dem Baculovirus-Expressionssystem wurden in Anlehnung an O'Reilly (O'Reilly *et al.*, 1994) durchgeführt.

3.5.1 Zellkultur

Spodoptera frugiperda (Sf9) Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden in Sf-900 II SFM als Monolayer in Zellkulturflaschen bei 27 °C kultiviert. BTI-TN-5B1-4 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden in Express Five SFM mit 10 µg/ml Gentamycin und 9 % 200 mM L-Glutamin ebenfalls als Monolayer bei 27 °C kultiviert. Die Zellen wurden in einem Rhythmus von 3 bis 4 Tagen bei einer Dichte von 2×10^7 Zellen/185 cm² Wachstumsfläche in 25 ml Medium umgesetzt. Die Vitalität wurde regelmäßig durch Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop untersucht. Das Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers.

3.5.2 Aufbewahrung von Insektenzellen

Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer Lebensrate größer 95 % und einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml eingefroren. Dabei

wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und bei 1200 xg für 10 min zentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen aus 42,5 % (v/v) konditioniertem Medium, 42,5 % (v/v) frischem Medium 10 % DMSO und 5 % FKS aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) aliquotiert. Die Zellen wurden zuerst 2 h bei -20°C dann über Nacht bei -80°C und schließlich in flüssigen Stickstoff gelagert.

3.5.3 Transfektion von Sf9 Zellen

Die Transfektion von Sf9-Zellen erfolgte nach der Methode der Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitation. Sf9 Zellen (2×10^6) wurden in einem Volumen von 4 ml in einer 24 cm² Zellkulturschale angesetzt und für 1 h bei 27°C inkubiert. Zur Herstellung eines DNA Mixes wurden 0,5 µg *Baculo Gold* DNA mit 2–5 µg Transfervektor für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 ml Transfektionspuffer zugegeben. Das Medium wurde von den Zellen abgesogen und 1 ml frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde tropfenweise und unter leichtem Schütteln der DNA-Mix zugegeben, für 4 h bei 27°C inkubiert, die Zellen zweimal mit je 4 ml Medium gewaschen und anschließend für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Der Zellkulturüberstand, der die rekombinanten Viren enthielt, wurde abgenommen und nach Sedimentation für 5 min (1000 xg) bei 4°C gelagert.

3.5.4 Plaque Isolierung rekombinanter Baculoviren

Um aus dem polyklonalen Zellkulturüberstand der Transfektion monoklonale rekombinante Baculoviren zu erhalten, wurde ein Plaquetest durchgeführt. dazu wurden zwölf Zellkulturschalen (25 cm²) mit jeweils 2×10^6 Zellen in 4 ml Medium angesetzt, für 1 h bei 27°C inkubiert und anschließend das Medium abgenommen. Der Überstand der Transfektion wurde seriell verdünnt und in einem Doppelansatz je 0,5 ml der entsprechenden Verdünnung (10^{-3} – 10^{-7}) zu den Zellen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Medium wurde abermals abgenommen und durch 4 ml einer auf 37°C temperierten Agarlösung in Medium überschichtet. Nach dem Erkalten der Agarose wurde die Schale für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde anschließend zur Titerbestimmung einer Neutralrotfärbung unterzogen, die andere Hälfte diente zur Virusisolierung. Die Plaques wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze isoliert, in 1 ml Medium über Nacht bei 4°C resuspendiert und anschließend amplifiziert.

3.5.5 Amplifikation rekombinanter Viren

Rekombinante virale Plaques wurden über zwei Runden amplifiziert. Für die erste Amplifikation wurden 2×10^6 Sf9 Zellen in einer 25 cm² Flasche in 4 ml Medium angesetzt, für 1 h bei 27 °C inkubiert, das Medium abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml des resuspendierten Plaques infiziert. Nach 1 h leichtem Schütteln bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml Medium zugegeben und die Zellen für 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Nach Überprüfung der Infektion unter dem Mikroskop wurde bei positiven Ansätzen der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000 xg, 4 °C) und als Passage 1 Stock bei 4 °C gelagert. Für die zweite Amplifikation wurden zwei 175 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 1×10^7 Sf9 Zellen in 20 ml Medium angesetzt, für 1 h bei 27 °C inkubiert, das Medium abgenommen und mit 1 ml des Passage 1 Stock (1:4 in Medium verdünnt) infiziert. Nach 1 h leichtem Schütteln wurden 19 ml Medium zugegeben, die Zellen für 4 Tage bei 27 °C inkubiert, der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000 xg, 4 °C) und als Passage 2 Stock bei 4 °C gelagert. Weitere Amplifikationen erfolgten mit einer MOI von 0,1 nach obigem Schema.

3.5.6 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Virustiters wurden Zellkulturschalen (25 cm²) mit jeweils 2×10^6 Zellen in 4 ml Medium angesetzt, für 1 h bei 27 °C inkubiert und anschließend das Medium abgenommen. Der Überstand der Transfektion wurde seriell verdünnt und in einem Doppelansatz je 0,5 ml der entsprechenden Verdünnung (10^{-4} – 10^{-8}) zu den Zellen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Medium wurde abermals abgenommen und durch 4 ml einer auf 37 °C temperierten Agarlösung in Medium überschichtet. Nach dem Erkalten der Agarose wurde die Schale für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Zum Anfärben der gebildeten Plaques wurden die Zellkulturschalen mit 3 ml einer auf 37 °C temperierten 0,5%igen Agaroselösung in Medium mit Neutralrot (5 µg/ml) überschichtet und erneut über Nacht bei 27 °C inkubiert. Die Plaques wurden anschließend ausgezählt und der Virustiter bestimmt.

3.6 Stabile Expression in Insektenzellen

Neben der transienten virusvermittelten Expression wurde die Fucosyltransferase V außerdem stabil in Insektenzellen exprimiert. Hierzu wurde das *InsectSelect*-System von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

3.6.1 Transfektion

Zur Expression in Insektenzellen wurde der Expressionsvektor durch das Cellfectin Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) in die Zelle gebracht. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

3.6.2 Expression unter Selektionsdruck

Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Generierung stabil exprimierender Linien angestrebt, wobei die Transfektionsansätze nach zwei Tagen durch Zugabe von Blastocidin in Kultur gehalten und subkultiviert wurden. Zur Stabilisierung wurde eine Konzentration von 50 µg/ml des Antibiotikums gewählt. Nach zwei Wochen konnte die Konzentration auf 10 µg/ml verringert werden.

3.7 Expression von Fucosyltransferase V in Säugetierzellen

Für die Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V standen verschiedene Zelllinien zur Verfügung. CHO-Zellen aus den Ovarien eines chinesischen Hamsters enthalten ein RNA-Polymerasegen, welches mit einem Kernlokalisationssignal versehen wurde. HEK 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, sie sind für eine transiente oder stabile Expression verwendbar.

3.7.1 Kultivierung und Passagieren von CHO- und HEK293-Zellen

Die CHO-Zellen oder HEK293-Zellen wurden im Inkubator (Heraeus Instruments Begasungsbrutschrank 6060) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Bei den CHO-Zellen und HEK293-Zellen erfolgte das Wachstum in DMEM-Medium (Gibco/BRL, Eggenstein). Allen Medien wurde 10 % FKS (Biochrom, Berlin) und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt. Sobald die Zellen konfluent in den Gewebekulturflaschen (75 cm², Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gewachsen waren, wurden sie in eine neue Kulturflasche passagiert. Der Zellüberstand wurde hierfür abgesogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurden 4 ml Trypsin/EDTA (Gibco/BRL, Eggenstein) gegeben und für 5 min im Inkubator inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden wurde dann durch leichtes Klopfen unterstützt und unter dem Mikroskop kontrolliert.

Bei nahezu vollständiger Ablösung wurde der Vorgang durch Zugabe von 10 ml Serum-haltigem Medium gestoppt, die Suspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1000 xg) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Serum-haltigem Medium resuspendiert und 1 bis 3 ml der Zellsuspension in eine neue Gewebekulturflasche gegeben und mit Serum-haltigem Medium bis zu einem Endvolumen von 12 ml aufgefüllt.

3.7.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und nach der Zentrifugation (5 min, 1000 xg) in FKS mit 10 % DMSO resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml in ein Kryoröhrchen (Cryo Tube Vials, Nunc, Wiesbaden) überführt. Zunächst wurde der Ansatz für 2 h bei -20°C , dann über Nacht bei -80°C inkubiert. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension mit 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1000 xg). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 12 ml Medium resuspendiert, um dann in eine 75 cm^2 Kulturflasche überführt zu werden.

3.7.3 Transfektion

Zur Expression in mammalen Zellen wurde der Expressionsvektor durch das Lipofektions-Reagenz *GenePorter* in die Zelle gebracht. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

3.7.4 Expression unter Selektionsdruck

Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Generierung stabil exprimierender Linien angestrebt, wobei die Ansätze der transienten Expression durch Zugabe von $10\ \mu\text{l/ml}$ Kulturmedium einer Stammlösung des Antibiotikums G418 in Kultur gehalten und subkultiviert wurden.

3.8 Chemische Modifikation von Proteinen und Peptiden

3.8.1 FITC-Markierung von Peptiden

Zur Bestimmung kinetischer Parameter wurde die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein angestrebt. Für die Kopplung an eine freie Aminogruppe wurde das reaktive Fluorescein-Iso-thiocyanat (FITC) in 3-fachem molarem Überschuß für 1 h bei RT in Reaktionspuffer (PBS) mit dem Peptid inkubiert. Die Edukte wurden mittels HPLC abgetrennt.

3.8.1.1 HPLC-Reinigung

Die Reinigung modifizierter Peptide mittels HPLC-Verfahren erfolgte zunächst im analytischen Maßstab, nach der Etablierung geeigneter Gradienten dann in präparativem Maßstab. Im allgemeinen wurden die Produkte unter Verwendung von Wasser und Acetonitril als Laufmittel (Puffer A und B, jeweils mit einer Konzentration von 0,1 % TFA) mit den in Tabelle 3.9 dargestellten Gradienten getrennt.

Dauer	Puffer A	Puffer B
Analytischer Lauf:		
20 min	75–30 %	25–70 %
5 min	30 %	70 %
Präparativer Lauf:		
25 min	75–30 %	25–70 %
5 min	30 %	70 %

Tabelle 3.9 Gradienten zur Reinigung von FITC-markiertem Peptid mittels HPLC.

3.8.1.2 MALDI-TOF

Zur Überprüfung des markierten Peptides bietet sich die Untersuchung der HPLC-Fractionen mit Hilfe von MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight*) an. Dazu werden Substanzmengen im fmol-Bereich mit einer niedermolekularen Matrix (Zimtsäure- oder Benzoessäure-derivate) kokristallisiert. Durch Laserbeschuß im Hochvakuum verdampft die

Matrix und reißt die Makromoleküle mit in die Gasphase. Ein Teil der Moleküle wird dabei ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt und in einem Flugzeitdetektor nach Masse getrennt.

Für die Analyse der Peptide wurde je $1\ \mu\text{l}$ der zu analysierenden Substanz einer Dihydroxy-Benzoesäure-Matrix (DHB) auf dem Probeneller kokristallisiert und im Spektrometer (Biflex III, Bruker) vermessen.

3.8.2 Biotin-Markierung von Proteinen

Die Biotinylierung rekombinanter Proteine wurde mit dem EZ-Link NHS-LC-Biotin-Reagenz (Pierce, Bonn) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Kopplung, bei der das Biotinylierungsreagenz in einem zwei- bis dreifachen molarem Überschuß eingesetzt wurde, wurde zwei mal gegen 2l PBS dialysiert. Anschließend wurde die Funktionalität der markierten Proteine mit Hilfe eines Aktivitätstest überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Expression der humanen Fucosyltransferase V

Die strukturelle Untersuchung der humanen Fucosyltransferase V erfordert die rekombinante Darstellung des Proteins in hoher Quantität. Für die Etablierung eines geeigneten Expressionssystems sollte im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Fucosyltransferase V sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen evaluiert werden.

4.1.1 Amplifikation und Klonierung der Fucosyltransferase V cDNA aus HEK 293 Zellen

Die für die rekombinante Expression notwendige cDNA der humanen Fucosyltransferase V wurde aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) amplifiziert. Da bei der Fucosyltransferase V, wie auch bei den meisten Fucosyltransferasen, die kodierende Sequenz auf einem einzigen Exon lokalisiert ist (Cameron *et al.*, 1995), konnte diese direkt aus genomischer DNA amplifiziert werden.

Genomische DNA wurde aus HEK 293 Zellen isoliert und mit den Oligonukleotiden pFucT5FwGen und pFucT5RevGen die kodierende Sequenz des FucT V-Gens amplifiziert. Das gereinigte Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI geschnitten, in den gleichermaßen behandelten Vektor pUC18 inseriert und, nach der Überprüfung der korrekten Sequenz, im folgenden pUC18FucT V genannt.

Da in dieser Arbeit das Enzym als verkürzte, lösliche Form dargestellt werden sollte, mußte ein Teil der *Stem*-Region, die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne deletiert werden. Studien über die Expression der FucT V als Fusionsprotein mit N-terminalem Protein A, ergaben, daß die ersten 75 Aminosäuren der FucT V nicht für die enzymatische Aktivität essentiell sind und gegen eine Protein A Fusions-Domäne ausgetauscht werden können (Xu *et al.*, 1996). Um bei der strukturellen Untersuchung der Fucosyltransferase V störende Einflüsse von Fusionsanteilen auszuschliessen, sollte das Enzym ohne Protein-A-Domäne exprimiert werden. Aus diesem Grunde wurde erwogen, einen Teil der *Stem*-Region bestehen zu lassen, um so eventuell stabilisierende Effekte eines N-terminalen Überhanges auszunutzen. Es gibt keine Berichte über eine erfolgreiche Expression humaner α 1,3/4-Fucosyltransferasen,

deren *Stem*-Region vollständig deletiert und gegen keine Fusionsdomäne ersetzt wurde. Welcher Teil der *Stem*-Region in dem zu exprimierenden Konstrukt erhalten bleiben sollte, wurde in erster Linie über Sequenzvergleiche mit der FucT III bestimmt, die in Insektenzellen bereits erfolgreich als lösliches Protein exprimiert wurde (Morais *et al.*, 2001). Ein analoges Konstrukt der Fucosyltransferase V kodiert die Aminosäuren A58–T374 und beinhaltet damit auch alle vier putativen N-Glycosylierungsstellen im Protein.

Für die sekretorische Expression in eukaryotischen Zellen wurde das Konstrukt analog zur Veröffentlichung von Morais mit der Signalsequenz des humanen β -Trace Proteins versehen.

Mit den Oligonukleotiden β -TraceFucTV und pFucTVRevGen wurde ein Konstrukt amplifiziert, welches die Signalsequenz und die Aminosäuren A58–T374 der humanen Fucosyltransferase V kodiert (Abbildung 4.1). Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI geschnitten und in den analog behandelten pUC18-Vektor inseriert. Der resultierende Vektor pUC18 β -TraceFucT V wurde durch eine Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

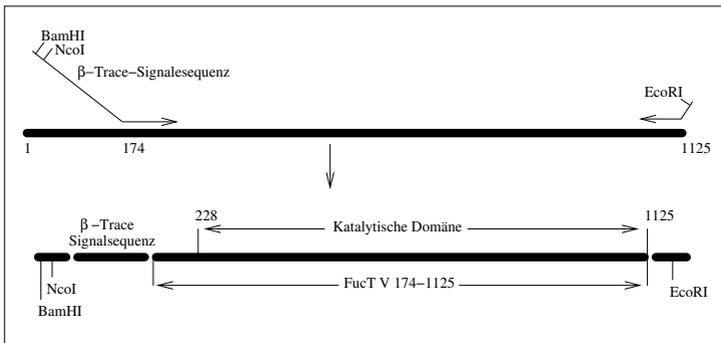


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Amplifikation der deletierten Fucosyltransferase V: Mit den Oligonukleotiden β -TraceFucTV und pFucTVRevGen wurde das 951 bp große Fragment der FucT V amplifiziert und am 5'-Ende mit der β -Trace-Signalsequenz versehen. Zusätzlich wurde das Konstrukt an den 5'- und 3'-Enden mit Restriktionsschnittstellen versehen.

4.1.2 Expression der Fucosyltransferase V in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* zeigt gegenüber der Expression in eukaryotischen Zellen große Vorteile auf. Das Expressionssystem ist leicht zu handhaben und das Protein kann oft in großen Mengen produziert werden. Da es sich dabei um ein prokaryotisches Expressionssystem handelt,

finden allerdings keine postrationalen Modifikationen statt und die Proteine erhalten oft nicht ihre native Faltung (Marston, 1986).

Die verkürzte lösliche Form (A59–T375) der Fucosyltransferase V sollte mit dem Vektor pRSETB als N-terminales Fusionsprotein mit einem Histidin-Hexamer („His-Tag“) in *E. coli* exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Plasmid pRSETB mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und PstI geschnitten. Die cDNA der verkürzten löslichen Form der Fucosyltransferase V wurde mit den Oligonukleotiden FucT5BamHIfw und FucT5PstIrev amplifiziert, analog geschnitten und in den Vektor pRSETB inseriert. Für die Expression der FucT V wurden mit dem Vektor pRSETBFucTV transformierte BL21(DE3) *E. coli*-Zellen bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ mit einer Konzentration von 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse der Expression wurden stündlich Proben des Expressionsansatzes durch Sonifikation aufgeschlossen und die löslichen Zellbestandteile von den unlöslichen getrennt. In den unlöslichen Fraktionen war nach einer Stunde eine schwache Bande mit dem Molekulargewicht von 41 kDa zu erkennen, deren Intensität nach drei bis vier Stunden ein Maximum erreichte. Die Analyse im Immunoprint zeigte, daß ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen rekombinante Fucosyltransferase V vorhanden war (Abbildung 4.2).

Das Molekulargewicht der verkürzten Form der Fucosyltransferase V beträgt 38 kDa. Unter Berücksichtigung des Fusionsanteils des „His-Tags“, ergibt sich für das rekombinante Protein ein Molekulargewicht von 41 kDa. Die Tatsache, daß in den löslichen Proteinfractionen keine rekombinante FucT V zu detektieren war, indiziert, daß das Protein in *E. coli* als unlösliches Proteinaggregat (*Inclusion Bodies*) (Marston, 1986) exprimiert wurde.

4.1.2.1 Versuche zur Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate

Da die humane Fucosyltransferase V in *E. coli* als unlösliche Proteinaggregate exprimiert wurde, sollten verschiedene Versuche unternommen werden, um die Proteine in eine lösliche Form zu überführen. Für die Evaluierung der geeigneten Rückfaltungsbedingungen wurde das *FoldIt*-Kit (Hamton-Research) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, 16 unterschiedliche Rückfaltungsbedingungen hinsichtlich der individuellen Anforderungen in relativ kurzer Zeit zu testen. Die Rückfaltung unlöslicher Proteine sollte derart erfolgen, daß durch Verdünnung der Proteinlösung die Konzentration der chaotropen Reagenzien so verringert wird, daß das Protein nicht mehr als unlösliches Proteinaggregat in Lösung gehalten werden kann. Durch Zusätze in den Puffersystemen kann das Ausfallen der Proteine zugunsten einer Rückfaltung verzögert werden. Hierbei spielen Additive wie Sucrose und L-Arginin eine

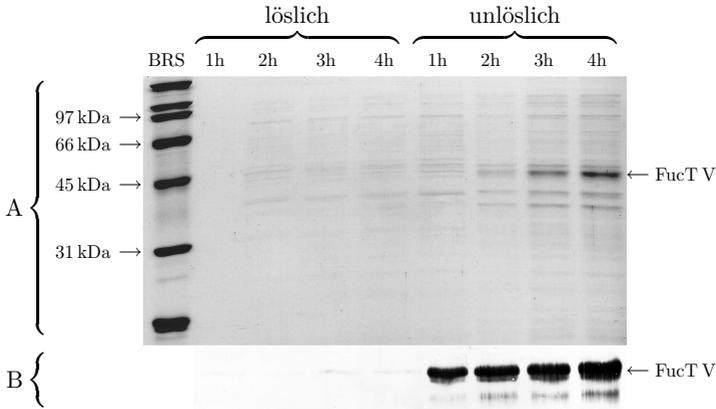


Abbildung 4.2 Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V in *E. coli*: Zur Analyse der Proteinexpression wurde nach der Induktion mit IPTG stündlich (1h–4h) ein Aliquot des Expressionsansatzes entnommen. Das Zellsediment wurde aufgeschlossen und die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Proben von löslichen und unlöslichen Bestandteilen wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (A). Die Proteine eines identischen Gels wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Bei dem anschließenden Immunoblot wurde mit dem Anti-Xpress Antikörper (1:5.000) für 2h inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus-AP-Konjugat (1:10.000) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP (B).

Rolle bei der Stabilisierung von Faltungsmitteln. Die Präsenz von reduzierenden und oxidierenden Reagenzien, wie z.B. oxidiertem und reduziertem Glutathion, unterstützt die richtige Ausbildung von Disulfidbrücken. Weitere Parameter die einen Einfluß auf die Bildung löslicher Proteine haben, können pH-Wert, Salzkonzentration und das Vorhandensein von Detergentien sein.

Für die Rückfaltung der Fucosyltransferase V wurde das vollständig denaturierte Protein 1:20 in den 16 unterschiedlichen Rückfaltungspuffern verdünnt und bei 4 °C für 14 h inkubiert. Ausgefallene Proteinaggregate wurden abgetrennt und alle 16 Ansätze gegen PBS dialysiert.

Die Verdünnung und die darauffolgende Dialyse gegen PBS führte in allen Ansätzen zu einer fast vollständigen Präzipitation der rekombinanten Fucosyltransferase V. Die Analyse in der SDS-PAGE zeigte, daß sich die unlösliche rekombinante FucT V in 5 von 16 Rückfaltungsansätzen in eine lösliche Form überführen ließ, wobei die Menge an rückgefaltetem Protein in allen Fällen sehr gering war (Abbildung 4.3). Die besten Ergebnisse wurden mit den Puffern 6 und 7 erzielt, die in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich waren und sich ausschließlich in der Präsenz von zweiwertigen Kationen und EDTA un-

terschieden.

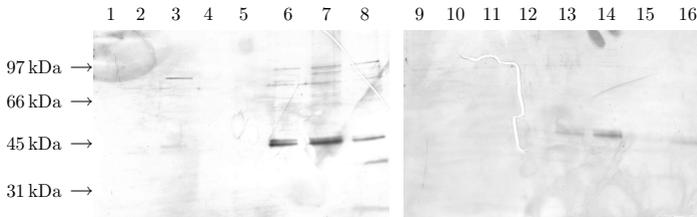


Abbildung 4.3 Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate: Je 50 μ l denaturierte FucT V Lösung (13 mg/ml) wurden in 16 verschiedenen Rückfaltungs-Puffern verdünnt (950 μ l) (1–16) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand gegen PBS dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden Proben jedes Rückfaltungsversuches auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und einer Silberfärbung unterzogen.

Die nun löslich vorliegende Fucosyltransferase V wurde hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Der in dieser Arbeit verwendete Aktivitätstest beruht auf der enzymatisch katalysierten Übertragung von Fucose von dem Nukleotid-Zucker GDP-Fucose auf den Akzeptorzucker N-Acetylglucosamin (LacNAc). Die Trennung von dem Produkt Le^x (ungeladen) und dem Donorzucker (negativ geladen) mittels Anionentauschern, ermöglicht unter Verwendung ¹⁴C-markierten GDP-Fucose die Quantifizierung des Produktes durch Messung der radioaktiven Strahlung. Die im Flüssigscintillationszähler bestimmte Radioaktivität ist damit direkt proportional zum gebildeten Produkt und läßt Aussagen über die enzymatische Aktivität des getesteten Proteins zu. Bei der rückgefalteten Fucosyltransferase V konnte mit Hilfe dieses Aktivitätstests auch nach dreistündiger Inkubation kein enzymatischer Umsatz festgestellt werden.

4.1.1.2 Klonierung und Expression der Fucosyltransferase V als MBP-Fusionsprotein

Da die Fucosyltransferase V in *E. coli* ausschließlich als unlösliches Proteinaggregat gebildet wurde, wurde in Erwägung gezogen, das Enzym N-terminal mit dem periplasmatischen Maltose-Binding-Protein (MBP) (Maina *et al.*, 1988) aus *E. coli* zu fusionieren. Das MBP ermöglicht die Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Amylose-Affinitätsmatrix und führt bei der Expression als Fusionsprotein zu einer erhöhten Bildung von löslichem Protein.

Für die Expression des MBP-FucT V-Fusionsproteins wurde der Vektor pMalp2X verwendet. Dieser Vektor beinhaltet das *malE*-Gen unter der Kon-

trolle des *lac*-Promotors und ermöglicht die Klonierung von Zielgenen am 3'-Ende dieses Gens. Die verkürzte Form der FucT V cDNA wurde mit den Oligonukleotiden pmalfw und pmalrev aus pUC18FucT V amplifiziert und über die eingeführten Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII in den Vektor inseriert. Um Mutationen, die durch die PCR entstanden sein könnten auszuschließen, wurden einige erhaltene Klone sequenziert.

Die Expression erfolgte in BL21(DE3)-Zellen über 4 h bei 37 °C und einer Induktorkonzentration von 1 mM IPTG. Die Zellen wurden aufgeschlossen und der Zellextrakt über eine Amylose-Affinitätsmatrix säulenchromatographisch gereinigt (Abbildung 4.4). Die Analyse der Reinigung zeigte im SDS-Polyacrylamidgel eine dominierende Bande bei 83 kDa, sowohl im Zellextrakt als auch in den Elutionsfraktionen. Die verkürzte Fucosyltransferase V hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. Unter Berücksichtigung des Fusionsanteils des MBPs, ergibt sich für das rekombinante Protein ein Molekulargewicht von 83 kDa. Zusätzlich zum MBP-FucT V-Fusionsprotein erschienen auch andere Proteine in den Elutionsfraktionen der Reinigung, welche ein minimales apparentes Molekulargewicht von 45 kDa aufzeigten. Da diese Proteine ebenfalls spezifisch mit Maltose von der Amylosematrix eluiert werden konnten, handelte es sich möglicherweise um Translationsabbrüche.

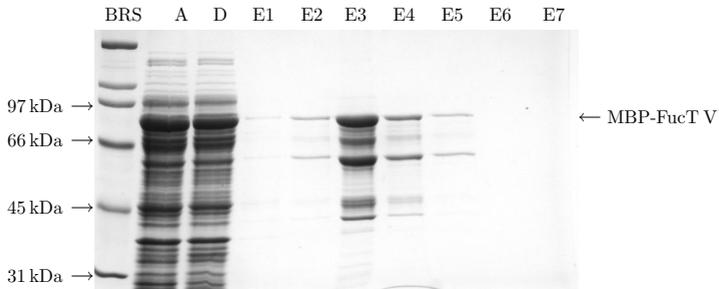


Abbildung 4.4 Reinigung des Fusionsproteins MBP-FucT V: Die Zellen eines 250 ml MBP-FucT V Expressionsansatzes wurden aufgeschlossen und über eine Amylose-Säule (0,6x10 cm) gereinigt. Von dem Zellaufschluß (A), dem Durchlauf (D) und den Elutionsfraktionen (E1–E7) wurden Proben entnommen, auf ein 9%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Coomassiefärbung unterzogen.

Deutlich ist zu erkennen, daß trotz der affinitätschromatographischen Reinigung ein Großteil des Fusionsproteins im Zellextrakt verblieb und nur ein geringer Teil an die Amylosematrix gebunden hat. Dies indiziert entweder eine geringe Kapazität oder einen sehr großen Anteil MBP-Fusionsanteil, der nicht in der Lage ist an die Matrix zu binden.

Um zu evaluieren inwieweit das erhaltene Fusionsprotein enzymatisch aktiv ist, wurden Elutionsfraktionen einem Aktivitätstest unterzogen. Trotz einer Konzentration von 100 µg/ml an gereinigtem Fusionsprotein, konnte kein enzymatischer Umsatz festgestellt werden.

Die Möglichkeit, lösliche Fucosyltransferase V sowohl durch Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate als auch durch die Expression als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* herzustellen, weist ein hohes Potential bei der Produktion dieses Enzyms auf. Die Löslichkeit indiziert an sich schon zumindest eine partiell richtige Faltung des Enzyms. Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang sind daher unbedingt notwendig. So könnte durch Versuche mit oxidiertem und reduziertem Gluthation *Redoxschuffling* Experimente durchgeführt werden, die eventuell die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken unterstützen und so zu einem enzymatisch aktivem Enzym führen.

4.1.2.3 Erzeugung von anti-Fucosyltransferase V Antiseren

Da zur Detektion rekombinanter Fucosyltransferase V kein polyklonales Serum vorlag, wurde das in *E. coli* exprimierte Protein zur Immunisierung genutzt. Hierzu wurde das über die Nickel-Chelatsäule vorgereinigte Protein auf einer präoperativen SDS-PAGE angereichert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die proteinhaltigen Gelstücke wurden getrocknet und fein zermahlen zur Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt. Zur Steigerung der Immunantwort wurden nach der Primärimmunisierung im Abstand von zwei bis drei Wochen zwei Folgeimmunisierungen durchgeführt. Die Seren wurden von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt und die Reaktivität gegen FucT V im ELISA getestet (Abbildung 4.5).

Der Anstieg der Reaktivität der Immunsereen gegenüber dem Präimmunsersum indiziert eine erfolgreiche Bildung spezifischer Antikörper gegen die FucT V. Deutlich ist zu erkennen, daß bei einer Serumverdünnung von 1:100 die Steigerung des Signals gegenüber dem Präimmunsersum optimal ist und eine höhere Konzentration zu schlechteren Ergebnissen führte. Um den Antikörper im Immunoprint zu verwenden und eine Verringerung des Hintergrundes zu erreichen wurden die Serum-IgG mittels einer Protein-A Affinitätssäule gereinigt. Das gereinigte polyklonale Serum wurde für die Detektion der Fucosyltransferase V im Immunoprint in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

4.1.3 Expression der Fucosyltransferase V in Säugertierzellen

Da die Expression der Fucosyltransferase V in *E. coli* ausschließlich zur Bil-

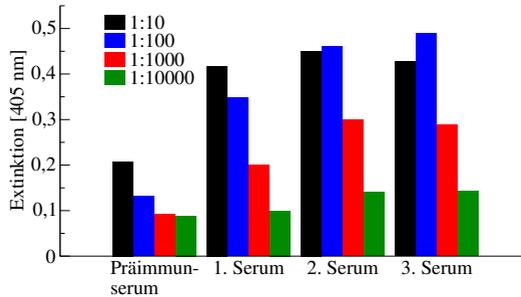


Abbildung 4.5 Reaktivität der gewonnenen Antisera im ELISA: Die gewonnenen Antisera vor (Präimmunsersum) und nach den jeweiligen Immunisierungen wurden im ELISA auf ihre Reaktivität getestet. Die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte wurden über Nacht bei 4°C mit rekombinanter FucT V (50 µl, 50 µg/ml) inkubiert. Danach wurde 2 h bei Raumtemperatur mit Blockierpuffer blockiert. Die Detektion der FucT V erfolgte mit dem anti-FucT V Serum unterschiedlicher Verdünnungen (1:10–1:10.000) über Nacht und einem anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:5.000) für 2 h. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen.

dung von unlöslichem Protein führte und auch eine Rückfaltung dieser Proteinaggregate nicht zu einer enzymatisch aktiven Form dieses Enzyms führte, sollte nun evaluiert werden, in welchem eukaryotischen Expressionssystem die Fucosyltransferase V aktiv und in hoher Ausbeute exprimiert werden kann. Durch die hohe Authentizität hinsichtlich der posttranslatorischen Modifikationen, sollten als erstes unterschiedliche Säugetierzelllinien hinsichtlich der rekombinanten Expression der Fucosyltransferase V untersucht werden.

Zur Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V standen verschiedene Säugetierzelllinien zur Verfügung. Um einen Vergleich der Ausbeuten führen und Aussagen über unterschiedliche posttranslatorische Modifikationen machen zu können, wurde die Fucosyltransferase V in CHO- sowie in HEK 293-Zellen exprimiert. Die Verwendung der humanen Zelllinie HEK 293 versprach eine möglichst authentische Glycosylierung der rekombinanten Fucosyltransferase V, die für eine Untersuchung der Bedeutung der Zuckerstrukturen wünschenswert erschien. CHO-Zellen weisen jedoch häufig deutlich höhere Expressionsraten auf und waren für die Herstellung größerer Mengen des rekombinanten Proteins geeignet. Für die Expression in Säugetierzellen wurde der Expressionsvektor pTriEx-4-Neo verwendet, welcher den viralen CMV_{ie}-Promotor enthält. Als Selektionsmarker enthielt der Vektor neben der Ampicillinresistenz zur Vermehrung in *E. coli* auch das Neomycinresistenzgen für die Generierung stabiler Säugetierzelllinien.

Zur Klonierung des Expressionsvektors wurde das Konstrukt β -Trace-FucT V(174–1125) mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und EcoRI aus

dem Vektor pUC18 β -TraceFucT V herausgeschnitten und in den Vektor pTriEx4-Neo inseriert.

Die Analyse im Immunoblot zeigte deutliche Expression sowohl in CHO- als auch in HEK-Zellen. Das apparente Laufverhalten entsprach in den CHO-Zellen einem Molekulargewicht von 90 und in den HEK-Zellen von 88 kDa. Dabei handelte es sich um FucT V Dimere, die unter reduzierenden Bedingungen im Immunoprint ein Molekulargewicht von 43 kDa aufwiesen. Durch die Reduktion der Dimere ist erkennbar, daß das Protein in CHO-Zellen homogen exprimiert wird und das Dimer aus zwei gleich schweren Untereinheiten besteht. Das in HEK 293-Zellen exprimierte Dimer scheint jedoch aus unterschiedlichen FucT V Spezies zu bestehen, da es unter reduzierenden Bedingungen als Doppelbande im Immunoprint erscheint (Abbildung 4.6). Bei einer Transfektionseffizienz von 40 % für beide Zelllinien ergab die densitometrische Auswertung für die Expression in CHO-Zellen die doppelte Ausbeute an rekombinanter Fucosyltransferase V gegenüber der Expression in HEK 293-Zellen.

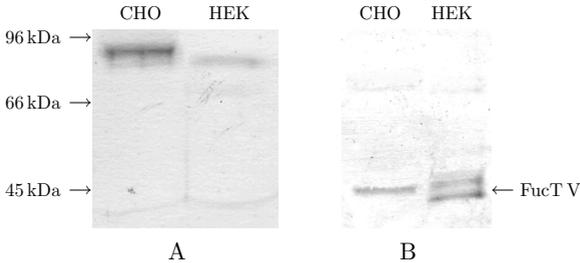


Abbildung 4.6 Expression von rekombinanter Fucosyltransferase V in unterschiedlichen Säugerzelllinien: Nach der Transfektion von CHO- und HEK 293-Zellen mit pTriEx β -TraceFucT V wurden die Zellen drei Tage bei 37 °C inkubiert. Expressionsüberstände wurden durch ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und einem Immunoprint unterzogen. Als Antikörper wurde gereinigtes polyklonales Serum gegen rFucT V (1:100) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP. A: Nicht reduzierend; B: Reduzierend.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Vermessung der transienten Expressionsüberstände im Aktivitätstest erzielt (Abbildung 4.7). Hierbei zeigte sich sowohl in den Expressionsüberständen der CHO-Zellen als auch der HEK 293-Zellen eine Fucosyltransferase-Aktivität, die allerdings bei den CHO-Zellüberständen doppelt so groß war. Die Expressionsraten wurde densitometrisch im Vergleich mit kommerziell erworbener Fucosyltransferase V bekannter Konzentration bestimmt und lagen bei 0,5–1,0 mg/l für CHO-Zellen und 0,2–0,8 mg/l für HEK-Zellen.

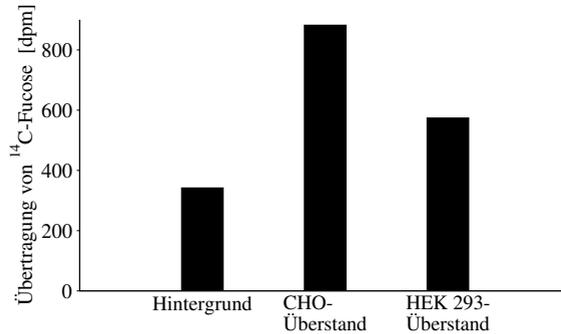


Abbildung 4.7 Expression der Fucosyltransferase V in Säugetierzellen; Es wurde analog der Abbildung 4.6 FucT V in CHO- und HEK 293-Zellen exprimiert. Die Kulturüberstände wurden mittels Aktivitätstest auf Fucosyltransferase-Aktivität überprüft.

4.1.4 Expression der Fucosyltransferase V mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystem

Die Expression in Säugetierzellen ermöglicht die Herstellung kleiner Mengen enzymatisch aktiver Fucosyltransferase V. CHO-Zellen sowie HEK 293-Zellen produzieren maximal 1 mg dieses Proteins pro Liter Expressionsansatzes. Diese Ausbeuten sind hinsichtlich der strukturellen Untersuchung des Enzyms als zu gering zu betrachten. Um größere Mengen an rekombinanter Fucosyltransferase V zu erhalten und die Reinigung des Proteins zu erleichtern, wurde das Baculovirus-Expressionssystem verwendet. Dieses System ermöglicht die virusinduzierte Proteinexpression in unterschiedlichen Insektenzelllinien und verspricht durch die Verwendung sehr starker viraler Promotoren hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein. Da Insektenzellen relativ einfach in serumfreiem Medium zu kultivieren sind, erlaubt dieser Ansatz zudem eine einfache Reinigung des Proteins. Durch Verwendung unterschiedlicher Transfervektoren konnte das Fucosyltransferase V Gen unter die Kontrolle unterschiedlich starker viraler Promotoren gestellt werden. Der Polyhedrinpromotor als auch der p10 Promotor werden in der sehr späten Phase der viralen Replikation aktiv, wobei der p10-Promotor als etwas schwächer beschrieben ist (Roelvink *et al.*, 1992). Um die Fucosyltransferase V in den Überstand zu sekretieren, wurde die lösliche Fucosyltransferase V als Fusionsprotein mit der Signalsequenz des β -Trace-Proteins exprimiert.

4.1.4.1 Klonierung unterschiedlicher Transfervektoren und Generierung rekombinanter Baculoviren

Für die Generierung von rekombinanten Baculoviren wurden unterschiedliche Transfervektoren verwendet. Im Vektor pVL1393 steht das Zielgen unter der Transkriptionskontrolle des Polyhedrinpromotors; beim Vektor pTriEx4-Neo steht das Zielgen unter der Kontrolle des p10-Promotors.

Für die Klonierung der verkürzten Form der FucT V wurde das Konstrukt β -TraceFucT V aus dem Vektor pUC18 β -TraceFucT V mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI in den Baculotransfervektor pVL1393 inseriert. Der Transfervektor pTriEx β -TraceFucT V entsprach dem Expressionsvektor der Säugetierexpression.

Sf9-Zellen wurden entweder mit dem Transfervektor pTriEx β -TraceFucT V oder dem Transfervektor pVL1393 β -TraceFucT V und mit linearisierter *BaculoGold*-DNA kotransfiziert. Infizierte Insektenzellen konnten nach 3–4 Tagen morphologisch mit einem geschwollenen Zellkörper, der Durchmesser nahm um etwa 25–50% zu, sowie einem größeren Zellkern, der fast das gesamte Zellvolumen einnahm, unter dem Mikroskop lokalisiert werden. In der späteren Phase der Infektion lösten sich die Zellen von der Wachstumsoberfläche und lysierten. Nach fünf Tagen wurden die gebildeten Viren entnommen und für eine spätere Amplifikation aufbewahrt (siehe Tabelle 4.1).

Transfervektor	Promotor	Rekombinanter Virus
pTriEx β -TraceFucT V	p10	p10FucT V
pVL1393 β -TraceFucT V	Polyhedrin	polFucT V

Tabelle 4.1 Übersicht der eingesetzten Transfervektoren und der rekombinanten Baculoviren

Die erhaltenen Virenpräparate polFucT V und p10FucT V wurden einem Plaquetest unterzogen, der sowohl der Titerbestimmung der Viruslösungen diente als auch zur Vereinzelnung der rekombinanten Viren verwendet wurde. Nach dreifacher Amplifikation der rekombinanten Viren betrug der Titer zwischen 10^7 und 10^8 pfu/ml, was für die Infektion von Insektenzellen und die Expression in kleinem Maßstab ausreichte.

4.1.4.2 Expression der Fucosyltransferase V

Zur Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems, wurden unterschiedliche Parameter getestet. Die Menge an zugeführtem Virus (*Multiplicity of Infection* MOI), der

eingesetzte Promotor und die Inkubationszeit sind Faktoren, die Einfluß auf die Expression haben können. Daher wurden BTI-TN-5B1-4-Zellen mit unterschiedlichen MOIs der rekombinanten Baculoviren polFucT V und p10FucT V infiziert, für 120 h bei 27 °C inkubiert und täglich sowohl die gebildete Proteinmenge anhand der enzymatischen Aktivität als auch zellbiologische Parameter wie Zellzahl und Zellvitalität bestimmt. Zur Evaluierung ab welchem Zeitpunkt nach der Infektion die Insektenzellen ihre Proliferation einstellen und sterben wurden in Abbildung 4.8 sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zellvitalität nach der Infektion von BTI-TN-5B1-4-Zellen mit polFucT V-Virus in unterschiedlichen MOIs gegeneinander aufgetragen.

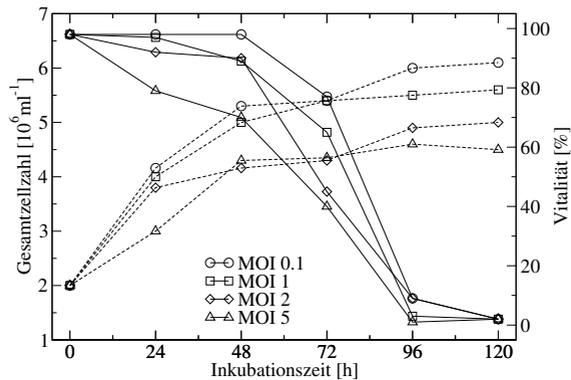


Abbildung 4.8 Zellbiologische Parameter bei der Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V in BTI-TN-5B1-4-Zellen: BTI-TN-5B1-4-Zellen (20 ml Suspensionskultur) wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit dem rekombinanten Baculovirus polFucT V infiziert. Hierbei wurden verschiedene Virusmengen (MOI 0,1–MOI 5) eingesetzt. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 27 °C und 80 rpm inkubiert. Täglich wurde ein Aliquot entnommen, um die Gesamtzellzahl (gestrichelte Linie) und die Vitalität der Zellen (durchgezogene Linie) zu bestimmen.

Bei allen Expressionsansätzen stieg die Gesamtzellzahl bis zum dritten Tag stark an und bleibt ab dem vierten Tag auf einem konstanten Niveau. Ausschließlich der Expressionsansatz, der mit einer MOI von 0,1 infiziert wurde, zeigte nach dem dritten Tag eine leichte Steigerung der Zellzahl. Deutlich zu erkennen ist auch, daß die maximal erreichte Zelldichte umso größer ist, desto weniger Virus bei der Infektion eingesetzt wurde. Die Vitalität der Zellen verhielt sich entgegengesetzt. In den ersten zwei Tagen der Expression waren unter dem Mikroskop kaum tote Zellen zu erkennen, wobei jedoch die Vitalität der Zellen, die mit einer MOI von 5 infiziert wurden, signifikant geringer war, als in den übrigen Ansätzen. Nach 96 h waren in allen Ansätzen kaum noch lebende Zellen zu finden. Der größte Einfluß der eingesetzten Virusmenge auf

die Zellvitalität macht sich nach 72 h bemerkbar. Zu diesem Zeitpunkt waren deutlich mehr tote Zellen zu erkennen als in den Ansätzen, die mit einer hohen MOI infiziert wurden.

Das Verhalten der mit dem p10FucT V-Virus infizierten BTI-TN-5B1-4-Zellen ist in Abbildung 4.9 dargestellt und zeigt keinen signifikanten Unterschied, sowohl in der Zellzahl als auch in der Zellvitalität gegenüber den mit dem polFucT V-Virus infizierten BTI-TN-5B1-4-Zellen.

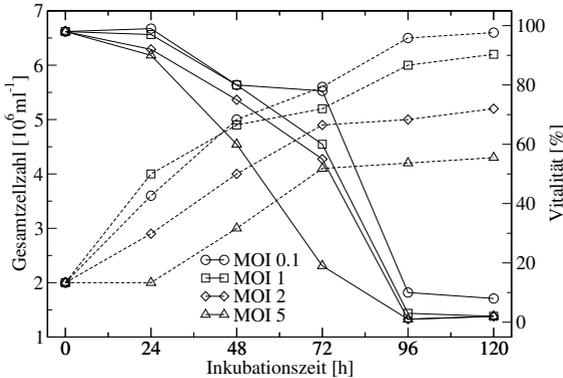


Abbildung 4.9 Zellbiologische Parameter bei der Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V in BTI-TN-5B1-4-Zellen: BTI-TN-5B1-4-Zellen (20 ml Suspensionskultur) wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit dem rekombinanten Baculovirus p10FucT V infiziert. Hierbei wurden verschiedene Virusmengen (MOI 0,1–MOI 5) eingesetzt. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 27 °C und 80 rpm inkubiert. Täglich wurde ein Aliquot entnommen, um die Gesamtzellzahl (gestrichelte Linie) und die Vitalität der Zellen (durchgezogene Linie) zu bestimmen.

Um Aussagen über die gebildete Proteinmenge treffen zu können, wurde von allen Expressionsansätzen täglich die Fucosyltransferase-Aktivität im Überstand bestimmt und relativ zueinander aufgetragen (Abbildung 4.10 auf Seite 62).

Am zweiten Tag war in den Überständen aller Expressionansätze eine signifikante Aktivität zu detektieren, die bis zum dritten Tag anstieg und dann konstant blieb. Die gebildete Aktivität nach 120 h war in fast allen Ansätzen ähnlich und zeigte die erwartete Tendenz, daß eine höhere MOI in einer gesteigerten Expression an rekombinantem Protein resultierte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, daß in fast allen Fällen der p10-Promotor bei gleicher MOI zu höheren Aktivitäten im Überstand führte, wobei die Unterschiede jedoch gering waren. Abweichend war der Verhalten wenn BTI-TN-5B1-4-Zellen mit dem polFucT V-Virus und einer MOI von 5 infiziert werden. Unter diesen

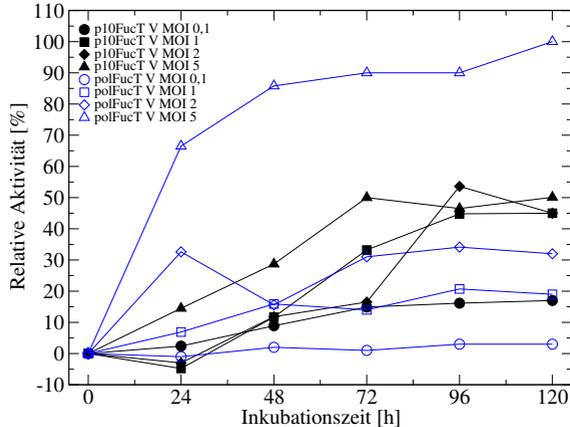


Abbildung 4.10 Expression der Fucosyltransferase V in BTI-TN-5B1-4-Zellen: BTI-TN-5B1-4-Zellen (20 ml Suspensionskultur) wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit den rekombinanten Baculoviren polFucT V bzw. p10FucT V infiziert. Hierbei wurden verschiedene Virusmengen (MOI 0,1–MOI 5) eingesetzt. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 27 °C und 80 rpm inkubiert. Täglich wurde ein Aliquot entnommen, die Fucosyltransferase V-Aktivität im Überstand bestimmt und relativ zueinander aufgetragen.

Bedingungen war zu allen Zeitpunkten die gebildete Menge rekombinanter FucT V signifikant höher als in allen Vergleichsansätzen.

Allgemein ist zu beobachten, daß in allen Expressionsansätzen die Proliferation an rekombinanter Fucosyltransferase V zu dem Zeitpunkt stagniert, an dem die Zellen am Ende der sehr späten Phase der Virusreplikation lysieren. Diese Ergebnisse indizieren, daß die virusinduzierte Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V durch den virusbedingten Tod der Zellen zustande kommt und nicht bedingt ist im Zusammenbruch des sekretorischen Weges und der Proteinfaltungsmaschinerie.

Um Aussagen über die Proteinexpression hinsichtlich Dimerisierung und eventueller Degradierung zu treffen, wurde der Expressionsverlauf im Immunoblot verfolgt. Nach der Infektion von BTI-TN-5B1-4-Zellen mit dem polFucT V-Virus und einer MOI von 5 konnte nach 48 h eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 86 kDa detektiert werden, dessen Intensität im Laufe der Zeit zunahm und nach 96 h ein Maximum erreichte. Zusätzlich war nach 96 h eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von 43 kDa zu erkennen (Abbildung 4.11). Wie auch in Säugetierzellen wurde die FucT V in Insektenzellen vorwiegend als dimeres Protein exprimiert, wobei in diesem Fall zusätzlich eine monomere Form zu detektieren war. Die densitometrische

Auswertung im Vergleich zu Fucosyltransferase V bekannter Konzentration ergab eine Expressionsrate von 1–2 mg/l.

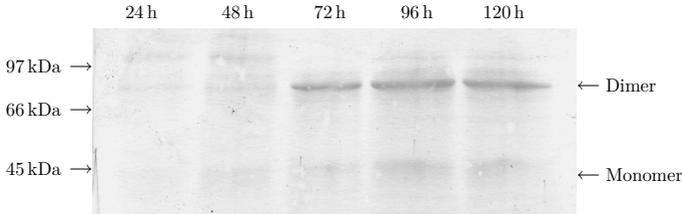


Abbildung 4.11 Analyse der FucT V-Expression in BTI-TN-5B1-4-Zellen: BTI-TN-5B1-4-Zellen (20 ml Suspensionskultur) wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml mit den rekombinanten Baculoviren polFucT V und einer MOI von 5 infiziert und für 120 h bei 27 °C und 80 rpm inkubiert. Täglich wurden Proben entnommen und auf ein 12 % iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und einem Immunoprint unterzogen. Als Antikörper wurde gereinigtes polyklonales Serum gegen rFucT V (1:100) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

4.1.4.3 Reinigung der rekombinanten Fucosyltransferase V

Für strukturellen Analysen müssen die zu untersuchenden Substanzen einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Die Reinigung der Fucosyltransferase V erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Costa (Costa *et al.*, 1997a).

Der Überstand eines 500 ml Expressionsansatzes wurde über eine GDP-Affinitätsmatrix gegeben, gewaschen und die spezifisch gebundene FucT V mit 3 mM freiem GDP eluiert. Trotz einer theoretischen Kapazität von mindestens 10 μ mol/ml und einem Säulenvolumen von 10 ml reichte die Kapazität der Matrix nicht aus, um die gesamte FucT V zu binden, so daß dieser Reinigungsschritt mehrfach wiederholt wurde, bis keine Fucosyltransferase-Aktivität mehr im Durchlauf detektierbar war.

Um die restlichen Verunreinigungen und das GDP abzutrennen wurde der pH-Wert der vereinten Elutionsfraktionen auf 6,0 eingestellt und in einem abschließenden Arbeitsschritt über eine MonoS-Kationentauschersäule gereinigt. Die gebundene FucT V wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (Abbildung 4.12). Die Analyse in der SDS-PAGE zeigte das Vorhandensein von FucT V in allen proteinhaltigen Elutionsfraktionen, wobei keine Trennung der monomeren und der dimeren Form erfolgte. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß die monomere Form der FucT V eine deutliche Heterogenität aufweist und als Tripelbande erscheint (Abbildung 4.13). Trotz des uneinheitlichen Elutionsprofils wurde mit dieser Reinigungsstrategie FucT V mit

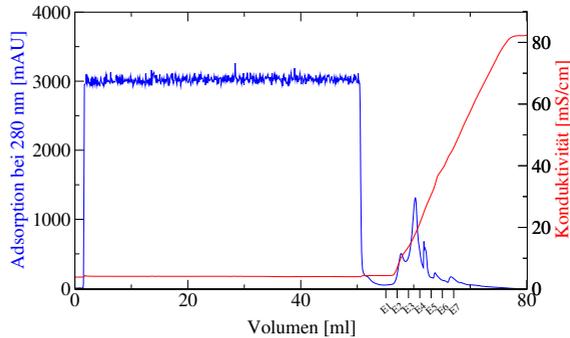


Abbildung 4.12 Reinigung der rekombinanten Fucosyltransferase V mittels Kationenausterschromatographie: Von der GDP-Affinitätssäule eluierte proteinhaltige Fraktionen wurden vereint und bei pH 6,0 über eine Kationenausterschromatographie (MonoS-Säule) gereinigt. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen NaCl Gradienten eluiert. Proteinhaltigen Fraktionen wurden auf Gehalt und Reinheit der Fucosyltransferase V überprüft (Abbildung 4.13).

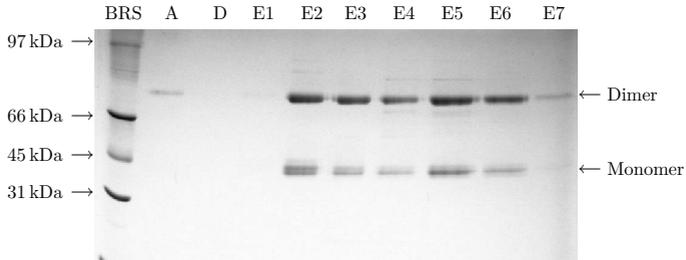


Abbildung 4.13 Reinigung der rekombinanten Fucosyltransferase V: Elutionsfraktionen der GDP-affinitätschromatographischen Reinigung wurden vereint (A) und bei pH 6,0 über eine Kationenausterschromatographie (MonoS-Säule) gereinigt. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen NaCl Gradienten eluiert (E1–E7). Die Elutionsfraktionen wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Coomassiefärbung unterzogen. D = Durchlauf, BRS = *broad range standard*

einem Reinheitsgrad von über 90% und einer Ausbeute von 0,5 mg/l bei einer Expressionsrate von 1–2 mg/l erhalten. Die spezifische Aktivität betrug 0,3 mmol/(mg Enzym × min).

4.1.5 Stabile Expression der Fucosyltransferase V in Insektenzellen

Da die viral induzierte Expression in Insektenzellen gezeigt hat, daß BTI-TN-5B1-4-Zellen für die Produktion rekombinanter Fucosyltransferase V geeignet

sind, wurde die Etablierung einer stabilen Insektenzelllinie angestrebt. Untersuchungen, bei denen die FucT III stabil in Sf9-Zellen exprimiert wurde, zeigen, daß die kontinuierliche Expression in einer stabilisierten Zelllinie zu deutlich höheren Ausbeuten an rekombinantem Protein führt (Morais und Costa, 2003).

4.1.5.1 Klonierung und Expression

Für die stabile Expression der Fucosyltransferase V in Insektenzellen wurde der Vektor pIB-V5-His verwendet. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Aus dem Vektor pUC18 β -TraceFucT V wurde das Insert mit BamHI und EcoRI ausgeschnitten und in den pIB-V5-His Vektor inseriert. BTI-TN-5B1-4-Zellen wurden mit dem erhaltenen Plasmid pIB β -TraceFucT V mit einer Effizienz von 70 % transfiziert und zur Stabilisierung mit 50 μ g/ml Blasticidin kultiviert.

Der zeitliche Verlauf der Expression zeigte schon nach 24 h im Immunoprint eine gut erkennbare Bande bei 86 kDa, deren Intensität im Laufe der Zeit zunahm und nach 120 h ein Maximum erreichte. Nach 72 h war die Konzentration an Protein im Kulturüberstand so hoch, daß auch das FucT V Monomer detektierbar war. Es zeigte sich auch hier, daß das Monomer im Immunoblot als Tripelbande erscheint (Abbildung 4.14). Die densitometrische Analyse ergab im Vergleich mit Fucosyltransferase V bekannter Konzentration eine Expressionsrate von 10–12 mg/l. Die spezifische Aktivität betrug 0,37 mmol/(mg Enzym \times min).

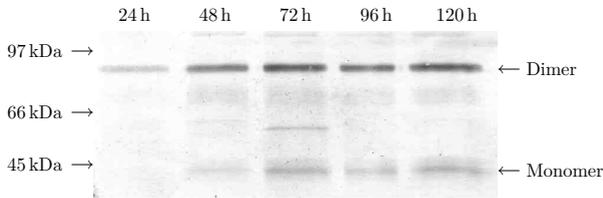


Abbildung 4.14 Analyse der Expression der Fucosyltransferase V in stabil transfizierten Insektenzellen: In 25 cm²-Zellkulturschalen wurden je 2×10^6 stabilisierte BTI-TN-5B1-4-Zellen ausgesät und bei 27 °C inkubiert. Alle 24 h wurde eine Probe (24 h–120 h) entnommen und nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit anti-FucT V Serum (1:100) und einem anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000) unter Verwendung von NBT/BCIP.

4.2 Strukturelle Untersuchung der rekombinanten humanen Fucosyltransferase V

4.2.1 Einfluß der Dimerisierung auf die enzymatische Aktivität

Da das exprimierte Fucosyltransferase V Konstrukt in allen Zelllinien zu einem überwiegendem Maße als Dimer exprimiert wurde, wurde der Einfluß dieser Dimerisierung auf die enzymatische Aktivität untersucht werden. Zur Spaltung der Dimere wurde die gereinigte rekombinante Fucosyltransferase V aus Insektenzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen DTT behandelt. Schon bei geringen DTT-Konzentrationen (1 mM) führte dies zur vollständigen Bildung von FucT V Monomeren, welche eine hohe Heterogenität aufweisen und in der SDS-PAGE als Tripelbande erscheinen (Abbildung 4.15).

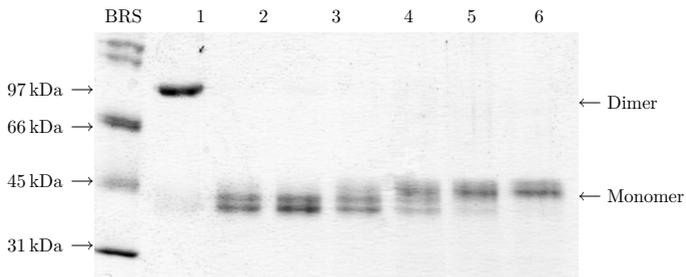


Abbildung 4.15 Reduktion der rekombinanten Fucosyltransferase V mit DTT: Gereinigte rekombinante Fucosyltransferase V (300 µg/ml) wurde mit verschiedenen Konzentrationen DTT behandelt. Dabei wurde mit 0 mM (1), 1 mM (2), 5 mM (3), 10 mM (4), 20 mM (5) und 50 mM (6) DTT für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Coomassiefärbung unterzogen (BRS = *broad range standard*).

Die Analyse der enzymatischen Aktivitäten zeigte bei geringen Konzentrationen an DTT (1–10 mM) eine signifikante Steigerung. Bei höheren Konzentrationen (20–50 mM) nahm die Aktivität stark ab und bei 50 mM DTT war nur noch die Hälfte des ursprünglichen Umsatzes zu detektieren (Abbildung 4.16).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Dimerisierung des in dieser Arbeit gewählten Konstruktes weder auf eine falsche Faltung zurückzuführen ist, noch dafür sorgt, daß die dimere Form der Fucosyltransferase V enzymatisch inaktiv ist.

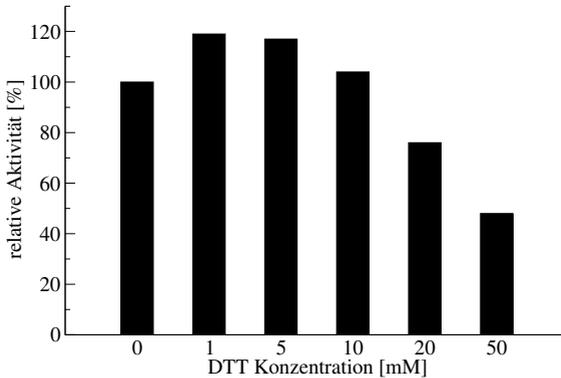


Abbildung 4.16 Reduktion der rekombinanten Fucosyltransferase V mit DTT: Die wie in Abbildung 4.15 behandelten Proteinproben wurden einem Aktivitätstest unterzogen und die gemessenen Werte relativ zur Aktivität der nicht reduzierten FucT V aufgetragen.

4.2.1.1 Identifizierung der für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren

Die Reduktion der Fucosyltransferase-Dimere in eine monomere Form durch DTT ohne Verlust der Aktivität indizierte, daß intermolekulare Disulfidbrücken spezifischer Cysteine für diese Dimerisierung verantwortlich sind.

Das in dieser Arbeit exprimierte Konstrukt enthält sechs Cysteinreste (Cys64, Cys94, Cys104, Cys156, Cys351, Cys354). Bei den meisten Glycosyltransferasen werden der C-Terminus und die Proteindomäne, die direkt hinter der *Stem*-Region liegt, durch mehrere Disulfidbrücken zusammengehalten und formen so das katalytische Zentrum (de Vries *et al.*, 2001). Bei der Fucosyltransferase V wurde postuliert, daß Cys94 mit Cys354 sowie Cys104 mit Cys351 diese Brücken ausbilden (Holmes *et al.*, 2000) und damit nicht für die Dimerisierung verantwortlich sein können (siehe Abbildung 1.5). Um das für die Dimerisierung verantwortliche Cystein zu identifizieren, wurden Mutanten der Fucosyltransferase V kloniert, bei denen entweder das Cys64 (C64S) oder das Cys156 (C156S) gegen Serin getauscht ist. Zusätzlich wurde eine Doppelmutante (C64S/C156S) kloniert und alle Konstrukte in BTI-TN-5B1-4-Zellen exprimiert.

Zur Generierung der unterschiedlichen Mutanten, wurden über Orts-spezifische Mutagenese die jeweiligen Nukleotide ausgetauscht (Abbildung 4.17).

	192	468
wt:	... TCC CGC TGC CAG GAC ...//... AGC AAC TGC CGG CAC ...	
	Ser Arg Cys Gln Asp	Ser Asn Cys Arg His
C64S:	... TCC CGC aGC CAG GAC ...//... AGC AAC TGC CGG CAC ...	
	Ser Arg Ser Gln Asp	Ser Asn Cys Arg His
C156S:	... TCC CGC TGC CAG GAC ...//... AGC AAC aGC CGG CAC ...	
	Ser Arg Cys Gln Asp	Ser Asn Ser Arg His
C64S/C156S:	... TCC CGC aGC CAG GAC ...//... AGC AAC aGC CGG CAC ...	
	Ser Arg Ser Gln Asp	Ser Asn Ser Arg His

Abbildung 4.17 Schematische Darstellung der eingefügten Mutationen.

Zu diesem Zweck wurde die *QuikChange* Methode (Wang und Malcolm, 1999) angewandt und ausgehend vom Vektor pUC18 β -TraceFucT V die Mutante C64S mit den Oligonukleotiden a19t und a19tantisense eingeführt. Die Mutante C156S wurde mit den Oligonukleotiden t295a und t295a antisense generiert. Die entsprechenden Mutationen in den Plasmide pUC18 β -TraceFucT VC64S und pUC18 β -TraceFucT VC156S wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die mutierten Konstrukte wurden analog zum Wild-Typ in den Vektor pIBV5His umgesetzt. Die Doppelmutante C64S/C156S wurde mit den Primern t295a und t295a antisense aus der Mutante C64S generiert und ebenfalls nach Bestätigung der korrekten Sequenz in den Vektor pIB-V5-His inseriert.

BTI-TN-5B1-4-Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden pIB β -TraceFucT VC64S, pIB β -TraceFucT VC156S und pIB β -TraceFucT VC64S/C156S mit einer Effizienz von 70 % transfiziert und über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen unter Selektionsdruck durch Blasticidin stabilisiert.

Zur Analyse der Expression wurden sowohl von den stabilisierten BTI-TN-5B1-4-Zellen, die das Wild-Typ-Konstrukt exprimierten, als auch von den drei Mutanten, 20 ml-Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen angesetzt und für 120 h bei 27 °C inkubiert. Täglich wurden Proben entnommen und auf Fucosyltransferase-Aktivität untersucht. Der zeitliche Verlauf der Aktivitäten im Überstand zeigte sich für alle Konstrukte gleich (Abbildung 4.18). Dieses Ergebnis belegt, daß der Austausch der Cysteine gegen Serin in den entsprechenden Konstrukten nicht zu einer inaktiven Form der Fucosyltransferase V führt und zeigt, daß die veränderte Primärstruktur des Enzyms keinen signifikanten Einfluß auf die Expressionsrate in Insektenzellen hat. Die Analyse im Immunoprint zeigte, daß das apparente Laufverhalten der Mutante C156S dem des Wild-Typ-Enzyms entsprach. Die Expression der Konstrukte, bei denen das Cys64 gegen Ser ausgetauscht wurde, führte ausschließlich zur Bildung der monomeren Form der FucT V (Abbildung 4.19). Diese Unterschiede im Laufverhalten indizieren, daß ausschließlich das Cys64 für die Dimerisierung verantwortlich war.

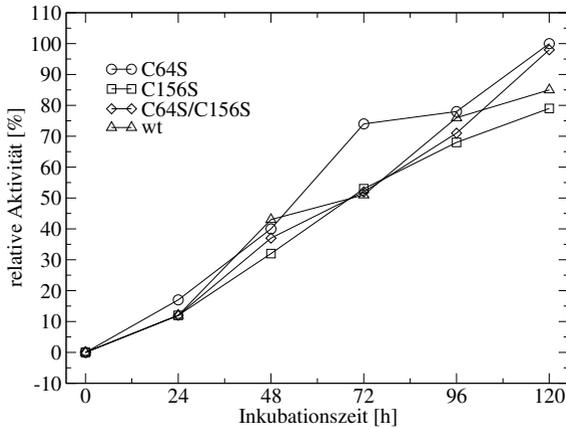


Abbildung 4.18 Expressionsanalyse der wt FucT V sowie der Mutanten C64S, C156S und C64S/C156S: Suspensionskulturen mit je 2×10^6 stabilisierten BTI-TN-5B1-4-Zellen wurden bei 27°C für 120h inkubiert. Täglich wurden Proben entnommen und die Fucosyltransferase-Aktivität bestimmt.

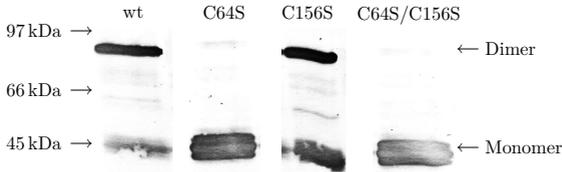


Abbildung 4.19 Expressionsanalyse der Wildtyp FucT V sowie der Mutanten C64S, C156S und C64S/C156S: Suspensionskulturen mit je 2×10^6 stabilisierten BTI-TN-5B1-4-Zellen wurden bei 27°C inkubiert. Nach 120h wurden Proben der Expressionsüberstände auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden einem Immunoprint unterzogen. Die Detektion der FucT V erfolgte mit dem anti-FucT V Serum (1:100) und einem anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

Zur Analyse der spezifischen Aktivität des Wild-Typs als auch der unterschiedlichen Mutanten wurden die vier Proteine aus ihren Expressionsansätzen gereinigt. Nach der Reinigung wiesen die Proteine eine Reinheit von 90 % auf. Unter reduzierenden Bedingungen hatten alle Mutanten ein identisches Laufverhalten in der SDS-PAGE (Abbildung 4.20).

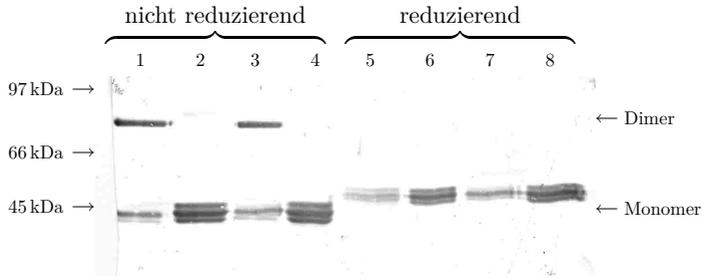


Abbildung 4.20 Analyse der Reinigung der FucT V Mutanten C64S (Bahn 2+6), C156S (Bahn 3+7), C64S/C156S (Bahn 4+8) und des wt (Bahn 1+5): Je 100 ml Kulturüberstand der unterschiedlichen FucT V Mutanten wurden über GDP-Agarose Affinitätschromatographie und anschließender Kationentauscherchromatographie gereinigt. Proben der gereinigten Proteine wurden unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Coomassiefärbung unterzogen.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der jeweiligen Mutanten sowie des Wild-Typ-Enzyms zeigte für alle Konstrukte keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.2 siehe unten).

Mutante	Spezifische Aktivität [mmol/(mg Enzym × min)]
wt-FucT V	0,37 ± 0,1
C64S-FucT V	0,32 ± 0,1
C156S-FucT V	0,35 ± 0,1
C64S/C156S-FucT V	0,40 ± 0,1

Tabelle 4.2 Ermittelte spezifische Aktivitäten der einzelnen Konstrukte: Je 250 ng ($5,5 \times 10^{-9}$ mol) rekombinantes Protein wurde für 20, 30, 40 und 50 min einem Reaktionsassay unterzogen. Der Umsatz pro Zeiteinheit konnte direkt aus der vermessenen Strahlungsmenge abgeleitet und gemittelt werden.

4.2.2 Untersuchung der Glycanstrukturen der rekombinanten Fucosyltransferase V

Die große Heterogenität der rekombinanten in Insektenzellen exprimierten Fucosyltransferase V verhindert eine strukturellen Untersuchung mit biophysikalischen Methoden. Besonders die Kristallisation von Proteinen ist stark abhängig von der Homogenität des eingesetzten Enzyms.

Verantwortlich für die Heterogenität könnten unterschiedliche Glycosylierungsformen des rekombinanten Proteins sein. Aus diesem Grund wurde die

Glycosylierung der in Insektenzellen exprimierten Fucosyltransferase V näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde die spezifische Bindung von Lektinen an Kohlenhydratstrukturen zur Identifizierung der endständigen Oligosaccharide ausgenutzt. Die hier verwendeten Lektine waren mit dem Steroidhaptan Digoxigenin konjugiert, wodurch eine immunologische Detektion der gebundenen Lektine möglich ist. Die Fucosyltransferase V wurde neben einem entsprechenden Kontrollprotein (Tabelle 4.3) auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und einem Lektinprint unterzogen. In Abbildung 4.21 ist erkennbar, daß das einzige gegen die FucT V reaktive Lektin das *Galanthus nivalis Agglutinin* (GNA) war, welches endständige Mannose erkennt, die $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ oder $\alpha(1-2)$ an Mannose gebunden ist. Diese Reaktivität indiziert das Vorhandensein von „high-mannose“ N-Glycanen, wie sie in Insektenzellen vorwiegend vorkommen.

Inwieweit die Zuckerstrukturen der rekombinant in Insektenzellen exprimierten Fucosyltransferase V tatsächlich verantwortlich für die beobachtete Heterogenität sind, kann durch die vollständige Deglycosylierung mit Hilfe von N-Glycosidasen aufgeklärt werden. Das vollständig deglycosylierte Protein sollte in diesem Fall als singuläre Bande in der SDS-PAGE-Analyse erscheinen.

Kontrollprotein	Masse	GNA	SNA	MAA	PNA	DSA
Carboxypeptidase Y (1)	63 kDa	+	-	-	-	-
Transferrin (2)	80 kDa	-	+	-	-	-
Fetuin (3)	68 kDa	-	+	+	-	+
Asialofetuin (4)	61 kDa	-	-	-	+	+

Tabelle 4.3 Liste der verwendeten Kontrollproteine und ihre Reaktivität gegenüber unterschiedlichen Lektinen: + starke Reaktion; - schwache Reaktion. GNA = *Galanthus nivalis Agglutinin*, SNA = *Sambucus nigra Agglutinin*, MAA = *Maackia amurensis Agglutinin*, PNA = *Peanut Agglutinin*, DSA = *Datura stramonium Agglutinin*

In Insektenzellen exprimierte, reduzierte und denaturierte FucT V wurde mit N-Glycosidase F deglycosyliert und das Laufverhalten analysiert. Im Immunoblot ist erkennbar, daß durch die Behandlung mit N-Glycosidase F die FucT V als singuläre Bande erscheint und ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht aufweist als die unbehandelte FucT V (Abbildung 4.22). Diese Veränderung im Laufverhalten indiziert, daß die Aufspaltung in eine Tripelbande bei der rekombinanten FucT V auf das Vorhandensein unterschiedlich glycosylierter Spezies zurückzuführen ist.

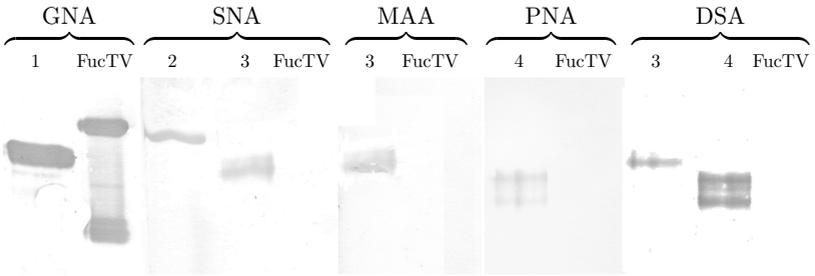


Abbildung 4.21 Untersuchung der Glycanstrukturen an in Insektenzellen exprimierter Fucosyltransferase V: Mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimierte rekombinante FucT V (100 ng) wurde neben den entsprechenden Kontrollproteinen (Tabelle 4.3) auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und einem Lektin-Immunoprint unterzogen. Für die Detektion wurden die entsprechenden Lektine und ein Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (1:1000) verwendet. Die Färbung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

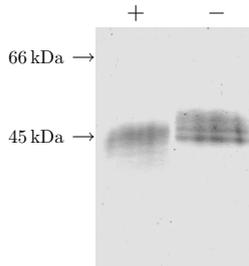


Abbildung 4.22 Deglycosylierung mit N-Glycosidase F: 100 ng in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimierte rekombinante FucT V wurden mit 1% SDS und 50 mM β -Mercaptoethanol für 5 min bei 100 °C denaturiert. Nach Zugabe von 1,25% Tween 20 und 5 U N-Glycosidase F (+) bzw. dem entsprechendem Volumen H_2O (-) wurde für 14 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden einem Immunoblot unterzogen. Die Detektion der FucT V erfolgte mit dem anti-FucT V Serum (1:100) und einem anti-Kaninchen-AP-Konjugat (1:10.000). Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von NBT/BCIP.

4.3 Selektion von Peptid-Bibliotheken gegen die Fucosyltransferase V

Die bisherige Entwicklung von spezifischen Fucosyltransferase-Inhibitoren basiert auf dem rationalen Design von Substrat- bzw. Übergangszustands-Analoga (Murray *et al.*, 1997, Qiao *et al.*, 1996 und Lee *et al.*, 2003). Diese Substanzen weisen jedoch nur eine geringe inhibitorische Wirkung oder Spezifi-

tät auf, da für Fucosyltransferasen keine für ein rationales Design notwendigen Strukturinformationen vorliegen. Die Nutzung kombinatorischer Ansätze, wie sie von Peptid-Bibliotheken repräsentiert werden, stellt einen differenteren Ansatz dar, der es ermöglicht eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Moleküle gegen die Fucosyltransferase V zu selektieren. Für die Selektion von Peptid-Bibliotheken eignet sich besonders die *Phage Display*-Technologie (Smith, 1985). Diese Technologie ermöglicht es komplett degenerierte Peptid-Bibliotheken unterschiedlicher Formate mit Hilfe von Phagen für eine Selektion zu präsentieren. Diese Technik wurde bereits zur Selektion von Epitop-Mimetika (Wu *et al.*, 2001), Inhibitoren (Koivunen *et al.*, 1999 und Chaudhary *et al.*, 2001), synthetischen Liganden, Glycomimetika (Lesinski *et al.*, 2001 und Murali und Kieber-Emmons, 1997) und DNA-Mimetika (Sibille *et al.*, 1997) erfolgreich angewandt.

Für die Anreicherung von spezifisch die Fucosyltransferase V bindenden Peptiden mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie standen Bibliotheken komplett degenerierter Heptapeptide mit einer Diversität von $1,2 \times 10^9$ zur Verfügung. Sie sind über einen kurzen Linker (Gly-Gly-Gly-Ser) mit dem N-Terminus des Hüllproteins gIIIp des M13-Bakteriophagen fusioniert. Da der dieser Bibliothek zugrunde liegende Vektor ein Derivat des Phagen-Wild-Typs ist, wird das Peptid von jedem Phagen in 4–6 facher Kopienzahl präsentiert.

Zwei unterschiedliche Heptapeptid-Bibliotheken wurden für die Selektion gegen die Fucosyltransferase V verwendet. Im ersten Ansatz wurde eine lineare Heptapeptid-Bibliothek eingesetzt. Die lineare Struktur der präsentierten Peptide ermöglicht aufgrund der hohen konformellen Flexibilität eine vielseitigere Anlagerung an das Zielprotein, und somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Bindung. Im zweiten Ansatz sollte eine Heptapeptid-Bibliothek verwendet werden, bei der die randomisierten Peptide von Cysteinen flankiert durch Bildung von Disulfidbrücken zu einem Ring geschlossen werden. Dieses Bibliotheksformat versprach, aufgrund der eingeschränkten Flexibilität der Peptide, eine erhöhte Spezifität bei der Bindung der Fucosyltransferase V.

Zur Anreicherung spezifisch bindender Phagen stehen eine Vielzahl von alternativen Strategien zur Verfügung, wobei eine generelle Differenzierung der Selektionsverfahren in Lösung und unter Verwendung von unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren wie Adsorption, kovalenter Bindung oder Nutzung von Affinitätssystemen vorgenommen werden kann. An das Zielprotein gebundene Phagen können entweder durch einen pH-Sprung eluiert, oder durch kompetitiven Inhibitoren verdrängt werden. Da für die Fucosyltransferase V kein geeigneter Inhibitor zur Verfügung stand konnten bindende Phagen ausschließlich über eine pH-Verschiebung eluiert werden.

Um Aussagen über den Erfolg der durchgeführten Selektionen machen zu

können, ist es entscheidend, ob die erhaltenen Phagen-Klone die Fucosyltransferase V hochspezifisch binden. Zu diesem Zweck sollten die Bindungseigenschaften der selektierten Phagen nicht nur gegen die Fucosyltransferase V, sondern auch gegen ein Referenzprotein analysiert werden. Hier für sollte die rekombinante DHFR aus *B. thermocatenuatus* (Golovacheva *et al.*, 1975) gewählt, da es aufgrund seiner hohen Stabilität einfach zu handhaben, und das rekombinante Protein in *E. coli* leicht zu produzieren ist. Außerdem hat das Protein weder funktionelle noch strukturelle Ähnlichkeit mit der Fucosyltransferase V, so daß spezifisch bindende Phagen keinerlei Kreuzreaktivitäten mit diesem Enzym zeigen dürften.

Die Expression dieses Vergleichsproteins erfolgte als Fusionsprotein mit C-terminalem „His-Tag“ in *E. coli*-Zellen. Hierfür wurden BL21(DE3)-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pET26DHFR-His transformiert waren, bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Reinigung der rekombinanten DHFR wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zellysate einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 25 mM Imidazol von der Säule gewaschen, bevor die DHFR mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM von der Säule eluiert wurde. Um das Protein von eventuell vorhandenen restlichen Verunreinigungen zu trennen und zu konzentrieren, wurden die Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie vereint und über eine Kationentauscherchromatographie bei pH 7,8 gereinigt (Abbildung 4.23).

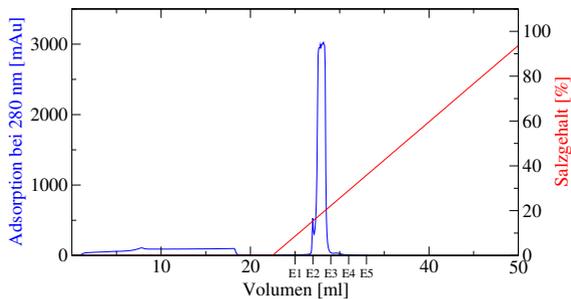


Abbildung 4.23 Reinigung der rekombinanten DHFR aus *B. thermocatenuatus* mittels Kationentauscherchromatographie: Vereinigte Elutionsfraktionen nach der Ni-Affinitätschromatographie wurden über eine MonoS-Säule gegeben. Der pH-Wert des Lauf- und Elutionspuffers betrug 7,8. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten von 0–1 M NaCl über 25 ml.

In der Analyse der Elutionsfraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE erschien die DHFR als singuläre Bande ohne erkennbare Verunreinigungen, so daß diese

Elutionsfraktionen für die späteren Applikationen einsetzbar waren (Abbildung 4.24).

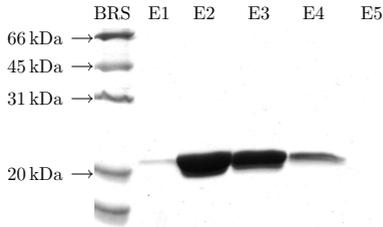


Abbildung 4.24 Analyse der Elutionsfraktionen nach der säulenchromatographischen Reinigung der DHFR mittels Kationenausterschromatographie: Die von der MonoS-Säule eluierten proteinhaltigen Fraktionen wurden auf ein 15% iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und einer Coomassiefärbung unterzogen (BRS = *broad range standard*).

4.3.1 Entwicklung und Charakterisierung linearer Peptid-Inhibitoren gegen die Fucosyltransferase V

Die Selektion der durch Phagen präsentierten linearen Heptapeptid-Bibliothek gegen die rekombinante Fucosyltransferase V erfolgte in den ersten beiden Selektionsrunden in Lösung mit biotinyliertem Protein, welches zum Waschen und Eluieren an Polystyroloberflächen-immobilisiertem Streptavidin gebunden wurde. Die Elution erfolgte bei einem pH-Wert von 2,2. Bei der dritten Selektionsrunde wurde auf die Verwendung von Streptavidin verzichtet und die Fucosyltransferase V kovalent an einer Epoxy-funktionalisierten Polystyrol-Oberfläche gebunden. Die gebundenen Phagen wurden wiederum mit Hilfe eines pH-Sprunges vom Zielprotein eluiert.

Nach der dritten Selektionsrunde war ein deutlicher Titeranstieg der eluierten Phagen festzustellen, was als ein Indiz für eine erfolgreiche Anreicherung bindender Phagen angesehen wurde (Abbildung 4.25).

Bei der Analyse der polyklonalen Phagen-Lösungen im ELISA war ein deutlicher Anstieg der Reaktivität gegen die FucT V zu beobachten, wobei jedoch sowohl Streptavidin als auch die DHFR als Negativkontrolle im verstärkten Maße erkannt wurde (Abbildung 4.26).

In einer ELISA-Analyse 12 einzelner Phagen zeigten nur fünf eine erhöhte Reaktivität gegen die Fucosyltransferase V. Allerdings bestätigt die Kreuzreaktivität mit der DHFR die auch schon in der polyklonalen ELISA-Analyse

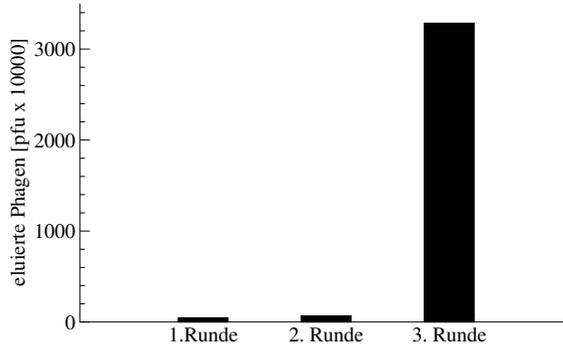


Abbildung 4.25 Anzahl der eluierten Phagen: Eine durch Phagen präsentierte lineare Heptapeptid-Bibliothek wurde 3 Runden gegen die FucT V selektiert. Dargestellt ist die Anzahl der nach der jeweiligen Selektionsrunde erhaltenen Phagen in 10^4 cfu.

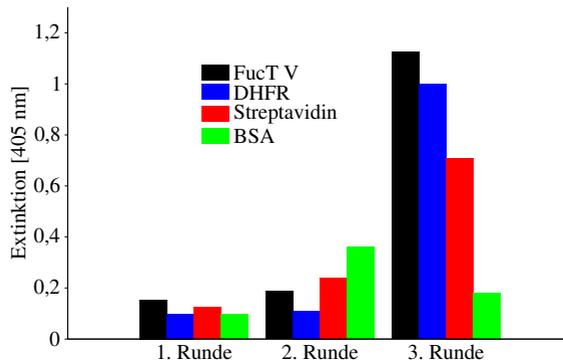


Abbildung 4.26 Polyklonaler Phagen-ELISA der Selektion linearer Heptapeptide gegen Fucosyltransferase V: Nach der Immobilisierung der FucT V auf der ELISA-Platte, wurden die Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrollen wurden zusätzlich Streptavidin und BSA auf der Polystyroloberfläche immobilisiert.

beobachtete Unspezifität (Abbildung 4.27). Kein analysierter Phagen-Klon erwies sich in der Analyse als spezifischer Binder der Fucosyltransferase V, so daß auf eine weitere Analyse verzichtet wurde.

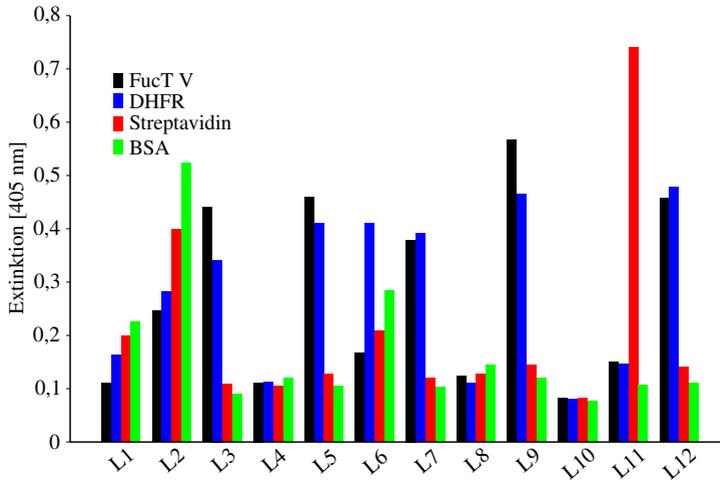


Abbildung 4.27 Monoklonaler Phagen-ELISA der Selektion linearer Heptapeptide gegen Fucosyltransferase V: Nach Immobilisierung der FucT V (50 µg/ml) auf der ELISA-Platte wurden die monoklonalen Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrollen wurde zusätzlich DHFR, Streptavidin und BSA auf der Polystyroloberfläche immobilisiert. Gezeigt sind die Daten der dritten Selektionsrunde.

4.3.2 Entwicklung und Charakterisierung zirkulärer Peptid-Inhibitoren gegen die Fucosyltransferase V

Bei der Selektion der zirkularisierten Heptapeptid-Bibliothek indizierte der Titeranstieg in der dritten Selektionsrunde deutlich eine Anreicherung spezifischer Phagen (Abbildung 4.28). Die Analyse der polyklonalen Phagen zeigte im ELISA eine deutlich gesteigerte Reaktivität gegen FucT V, wobei im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Selektion der linearen Heptabibliothek die Reaktivität gegen Streptavidin nur schwach über der BSA-Kontrolle lag. Die Reaktivität gegen die DHFR war jedoch in der polyklonalen ELISA-Analyse ähnlich hoch wie bei der Selektion der linearen Peptid-Bibliothek (Abbildung 4.29).

Nach der Analyse von 18 vereinzelt Phagen-Klonen im ELISA, erwiesen sich alle Klone als spezifische Binder der FucT V. Trotz der hohen Reaktivität gegen die DHFR in der polyklonalen ELISA-Analyse, zeigten die ausgewählten vereinzelt Phagen keinerlei Kreuzreaktivität gegen dieses Referenzprotein und auch nicht gegen BSA oder Streptavidin (Abbildung 4.30).

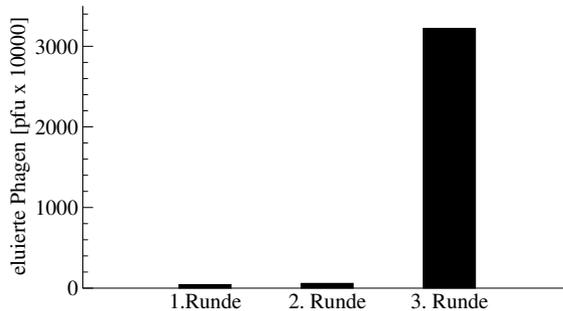


Abbildung 4.28 Anzahl der eluierten Phagen: Eine durch Phagen präsentierte zirkuläre Heptapeptid-Bibliothek wurde 3 Runden gegen die FucT V selektiert. Dargestellt ist die Anzahl der nach der jeweiligen Selektionsrunde erhaltenen Phagen in 10^4 cfu.

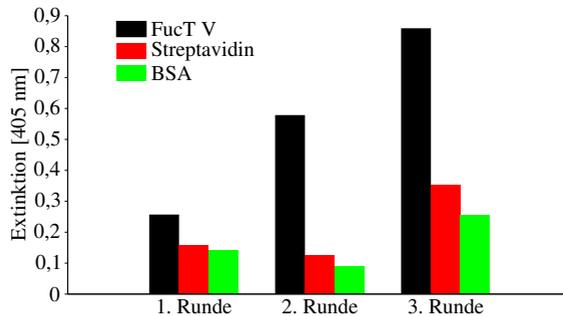


Abbildung 4.29 Polyklonaler Phagen-ELISA der Selektion zirkulärer Heptapeptide gegen Fucosyltransferase V: Nach der Immobilisierung der FucT V auf der ELISA-Platte, wurden die Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5.000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrollen wurden zusätzlich DHFR, Streptavidin und BSA auf der Polystyroloberfläche immobilisiert.

Auch das hohe Signal-Rauschverhältnis der Signale deutet auf eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen hin. Die 18 im ELISA untersuchten Phagen-Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen und die Primärstruktur der präsentierten Peptide ermittelt. Dabei ergaben sich 13 unterschiedliche Aminosäuresequenzen (Tabelle 4.4). Eine Sequenz wurde von vier Phagen repräsentiert und je zwei Sequenzen von zwei Phagen. Alle analysierten Peptidsequenzen waren der Konsensussequenz SPGMNWL sehr ähnlich. Hochkonserviert ist die Sequenz SPX_1MX_2WL bei der X_1 meistens Glycin (55 %) ist aber auch Serin (38 %) oder Alanin (5,5 %) sein kann. Die Position X_2 besitzt eine deutlich höhere Variabilität: Hier kann es sich um die Aminosäuren Asparagin

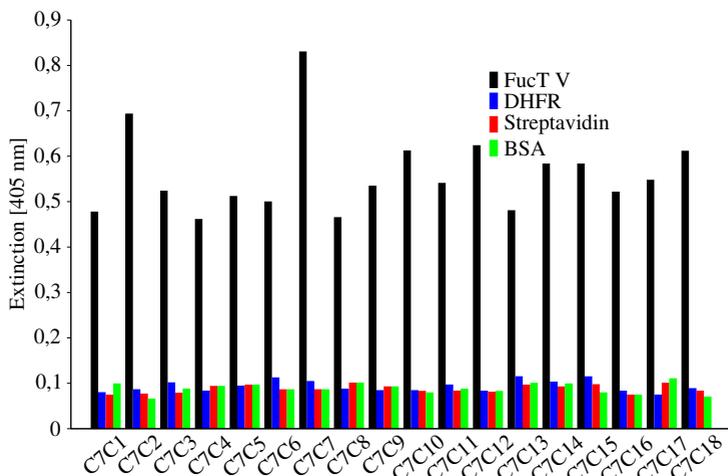


Abbildung 4.30 Monoklonaler Phagen-ELISA der Selektion zirkulärer Heptapeptide gegen Fucosyltransferase V: Nach Immobilisierung der FucT V auf der ELISA-Platte wurden die monoklonalen Phagen gebunden und mit einem anti-M13-POD-Konjugat (1:5000) detektiert. Die Farbentwicklung mit ABTS wurde bei 405 nm vermessen. Als Kontrollen wurden zusätzlich DHFR, Streptavidin und BSA auf der Polystyroloberfläche immobilisiert. Gezeigt sind die Daten der dritten Selektionsrunde.

(44 %), Alanin (22 %), Serin (11 %), Glutamin (5,5 %), Glutaminsäure (5,5 %) oder Leucin (5,5 %) handeln. Drei Peptide folgen nicht diesem Schema und weisen als erste Aminosäure ein Threonin statt Serin oder an der siebten Position ein Isoleucin statt eines Leucins auf.

4.3.3 Charakterisierung synthetischer Peptide

Aufgrund der guten Bindungseigenschaften und der großen Sequenzähnlichkeiten der selektierten Phagen sollten die Bindungseigenschaften eines synthetischen Peptides analysiert werden. Hierzu wurde das Peptid mit der Konsensussequenz CSPGMNWLCK synthetisiert und oxidativ zyklisiert. Durch das Einfügen eines terminalen Lysinrestes konnte das synthetische Peptid nach der Synthese chemisch modifiziert werden. Insbesondere die Fluoreszenzmarkierung und die Immobilisierung können für spätere Applikationen von Bedeutung sein.

Für die Untersuchung der Bindungseigenschaften des Peptides und der Fucosyltransferase V wurde das Peptid am terminalen Lysin Fluoreszein-markiert und mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) vermessen.

Klon	Peptidsequenz
C7C1	CSPAMEWLC
C7C2	CSPSMSWLC
C7C3	CSPGMNWLC
C7C4	CTPGMNWLC
C7C5	CSPGMAWLC
C7C6	CSPGMNWLC
C7C7	CSPGMNWLC
C7C8	CSPSMQWLC
C7C9	CSPSMAWLC
C7C10	CSPSMMWLC
C7C11	CSPGMNWLC
C7C12	CSPGMNWLC
C7C13	CSPSMLWLC
C7C14	CSPGMAWIC
C7C15	CSPGMNWIC
C7C16	CSPSMAWLC
C7C17	CSPGMNWLC
C7C18	CSPSMSWLC
Konsensussequenz:	CSPGMNWLC

Tabelle 4.4 Sequenzen der gegen Fucosyltransferase V selektierten zirkulären Heptapeptide.

Diese Methode ermöglicht durch die Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeiten die Charakterisierung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen in Lösung. Die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff erlaubt die direkte Beobachtung des Liganden mit Hilfe von Laseroptiken und somit direkte Rückschlüsse über die Brown'schen Bewegungen des Liganden sowie des Protein-Ligand-Komplexes.

Die FCS-Messungen zeigten selbst bei Konzentrationen von 22,5 nM für das markierte Peptid und 220 nM für die rekombinante FucT V eine deutliche Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit (Abbildung 4.31) und indizieren so eine hohe Affinität. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise, daß es sich bei dem synthetischen Peptid um einen spezifischen Liganden der Fucosyltransferase V handelt.

Zur Evaluierung, inwieweit dieser aus der Phagenselektion hervorgegangene spezifische Ligand ein Inhibitor der Fucosyltransferase V ist, wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des synthetischen Peptides ein Aktivitätstest durchgeführt (Abbildung 4.32). Deutlich ist erkennbar, daß das Peptid selbst bei einer Konzentration von 1 mM keine Einfluß auf den enzymatischen Umsatz aufweist.

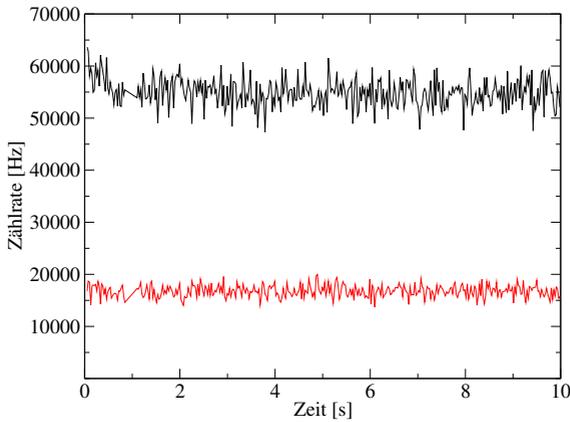


Abbildung 4.31 Analyse des Bindungsverhalten des synthetischen zirkulären Peptides CSPGMNLCK-FITC: Das FITC-markierte Peptid wurde mit einer Konzentration von 22,5 nM in einem Confocor LSM 510 META vermessen (schwarze Kurve). Durch Zugabe von 220 nM FucT V und Bindung an das Peptid ändert sich die Diffusionsgeschwindigkeit des Fluoreszeins (rote Kurve).

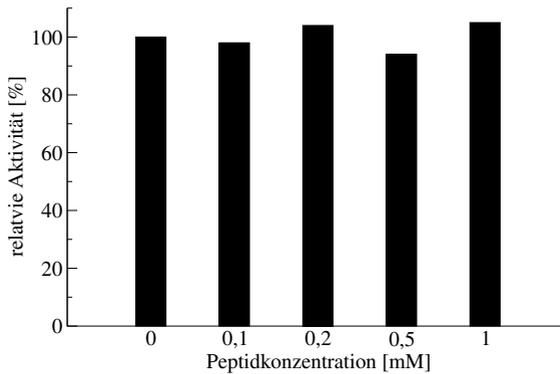


Abbildung 4.32 Charakterisierung des synthetischen Peptides CSPGMNLCK hinsichtlich seiner inhibitorischen Eigenschaften gegenüber der Fucosyltransferase V: 100 ng rekombinante FucT V wurden für 1 h bei RT mit unterschiedliche Konzentrationen des synthetischen Peptides inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Aktivitätstest untersucht und der enzymatische Umsatz relativ zueinander aufgetragen.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine lösliche Form der humanen Fucosyltransferase V in unterschiedlichen Expressionssystemen hergestellt werden und verschiedene Fragestellungen bezüglich Struktur-Funktions-Beziehungen beantwortet werden. Dabei standen die Aufklärung von Dimerisierungsmechanismen sowie die Untersuchung der Glycanstrukturen im Vordergrund. Desweiteren konnte mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie aus einer Peptid-Bibliothek ein Peptidligand gegen die Fucosyltransferase V selektiert werden.

5.1 Expression der Fucosyltransferase V

Die Expression in *E. coli* bietet den Vorteil, daß durch eine hohe Proliferation der Zellen sehr viel rekombinantes Protein in kurzer Zeit exprimiert wird. Mit Hilfe dieses Expressionssystems ist es möglich in kurzer Zeit und mit geringem Aufwand rekombinante Proteine herzustellen. Obwohl *E. coli*-Zellen nicht in der Lage sind das Protein postranslational zu modifizieren und auch die Ausbildung von Disulfidbrücken nur eingeschränkt möglich ist, gibt es zahlreiche Berichte über die erfolgreiche Expression sowohl von prokaryotischen, als auch eukaryotischen Glycosyltransferasen in *E. coli* (Kaminaga *et al.*, 2004, Kakuda *et al.*, 2004 und Gong *et al.*, 2004).

Für die Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V in *E. coli* wurden zwei unterschiedliche Strategien gewählt. In einem ersten Ansatz wurde das Enzym mit N-terminalem „His Tag“ exprimiert. Der zweite Ansatz beruhte auf der Annahme, daß die N-terminale Fusion mit dem Maltose-*Binding*-Protein die Bildung von löslichem Protein erleichtert.

Die Expression als „His Tag“-Fusionsprotein erfolgte unter der Kontrolle des sehr starken T7-Promotors. Bei der Analyse der Expression mittels der SDS-PAGE konnte nach 1 h eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 41 kDa detektiert werden, deren Intensität im Laufe der Zeit zunahm und nach 3 h ein Maximum erreichte. Die Analyse im Immunoblot zeigte, daß die Fucosyltransferase V nach dem Zellaufschluß ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen zu finden war, und somit das Protein als unlösliches Proteinaggregat (*Inclusion Bodies*) exprimiert wurde. Diese Bildung von Einschlußkörperchen wird bei der Expression heterologer Proteine in *E. coli* häufig beobachtet (Marston, 1986).

Bis heute wurden viele Strategien entwickelt, die Bildung von löslichem bzw. korrekt gefaltetem Protein bei der Expression zu unterstützen. Durch Koex-

pression mit Chaperonen konnte in einigen Fällen der Anteil an löslichem Proteins erhöht werden, jedoch sind positive Ergebnisse selten (Goloubinoff *et al.*, 1989). Die α -1,6-Fucosyltransferase aus *Rhizobium spa* konnte jedoch durch die Überexpression des Chaperonsystems GroEL/GroES als aktives korrekt gefaltetes Protein in *E. coli* exprimiert werden (Bastida *et al.*, 2003).

Eine weitere angewendete Methode, die Bildung von *Inclusion Bodies* zu vermeiden bzw. das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein zu verbessern, ist die Veränderung der Expressionsbedingungen in Hinblick auf eine verlangsamte Proliferation. So führt eine niedrigere Temperatur bei der Kultivierung von *E. coli*-Zellen zu einem verlangsamten Wachstum und somit auch zu einer geringeren Bildung des rekombinanten Proteins, welches dann vornehmlich in Lösung bleibt (Schein und Noteborn, 1989). Dieser Ansatz führte jedoch zu keiner Bildung von löslicher rekombinanter Fucosyltransferase V.

Die Rückfaltung unlöslicher Proteinaggregate stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz dar, lösliches und aktives Protein zu erhalten. Da nach der Rückfaltung häufig ein heterogenes Gemisch an funktionell aktivem und misgefaltetem Protein vorliegt, ist eine Abtrennung misgefalteter Proteine notwendig, jedoch meist nicht durchführbar. Die Möglichkeit richtig gefaltete Fucosyltransferase V über die spezifische Bindung an GDP-Agarose abzutrennen, läßt es vielversprechend erscheinen, daß durch eine Rückfaltung aktive Fucosyltransferase V erhalten werden kann

Um die als unlösliches Proteinaggregat exprimierte Fucosyltransferase V zu solubilisieren, wurden die Zellen mit 6 M GuHCl aufgeschlossen, das Protein über eine Ni-Chelatsäule gereinigt und so in sehr hohen Konzentrationen (13 mg/l) und 80 % Reinheit dargestellt. Die Rückfaltung von aufgeschlossenen und solubilierten Proteinen erfolgt in der Regel durch Dialyse oder Verdünnung. Durch diese Schritte wird die Konzentration an chaotropen Agentien verringert, so daß die denaturierte Form nicht mehr stabilisiert wird. In den meisten Fällen führt diese Prozedur zum Ausfallen des Proteins und nicht zu einer Rückfaltung in die native Konformation. Unterschiedliche Bedingungen in den verwendeten Puffersystemen jedoch können eine Rückfaltung unterstützen, indem sie das Ausfallen verzögern und Faltungsintermediate stabilisieren. Wie das Rückfaltungsprotokoll im Einzelnen auszusehen hat, ist für jedes Protein zu evaluieren und kann nicht vorausgesagt werden (Rudolph und Lilie, 1996). Substanzen, die in der Lage sind, Faltungsintermediate zu stabilisieren sind z.B. polare Additive (L-Arginin), Osmolyte (PEG), Detergentien (Lauryl Maltosid) oder geringe Konzentrationen an Chaotropen (Guanidin Hydrochlorid). Andere Parameter, die bei der Faltung von Proteinen eine Rolle spielen, sind der pH-Wert, die Ionenstärke, Proteinkonzentration oder die Anwesenheit von spezifischen Liganden. Da bei der Ausbildung der dreidimensionalen

Struktur der Fucosyltransferase V die Bildung von Disulfidbrücken notwendig ist (Holmes *et al.*, 2000), können niedermolekulare Thiolreagenzien in reduzierter und oxidiert Form für die Einstellung eines geeigneten Redoxpotentials im Rückfaltungspuffer verwendet werden (Ahmed *et al.*, 1975).

Die Rückfaltung der Fucosyltransferase V aus in *E. coli* exprimierten Einschlusskörpern erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des *FoldIt*-Kits. Auf diese Weise können 16 unterschiedliche Rückfaltungsbedingungen in kurzer Zeit getestet und so die für die Rückfaltung entscheidenden Bedingungen evaluiert werden. Zwei Rückfaltungspuffer erwiesen sich als geeignet, die Fucosyltransferase V in eine lösliche Form zu überführen. Der Vergleich dieser Pufferbedingungen lassen einen Rückschluß auf die für die Rückfaltung entscheidenden Parameter zu; Beide Puffer weisen einen basischen pH-Wert (pH 8,3) auf und haben gleiche Zusammensetzung an einwertigen Salzen (10,56 mM NaCl, 0,44 mM KCl) und eine gleiche Chaotrop-Konzentration (550 mM GuHCl). Für die Reduktion von Disulfidbrücken scheint die Anwesenheit von 1 mM DTT notwendig zu sein. Zweiwertige Kationen scheinen keinen Einfluß auf die Rückfaltung zu haben, da der erste Puffer eine Konzentration von 1,1 mM EDTA aufweist, der zweite Puffer jedoch hohe Mengen an Magnesium- und Calcium-Chlorid enthält. Das Verhältnis von eingesetztem vollständig denaturiertem Protein (100 µg) zu löslichem Protein (5 µg) ist jedoch als zu klein anzusehen, um mit dieser Methode lösliche Fucosyltransferase V im präparativem Maßstab herzustellen. Bei den durchgeführten Aktivitätstests konnte keine Fucosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden, auch wenn die Inkubationszeit auf das Dreifache des Üblichen erhöht wurde. Die Menge an eingesetztem Enzym (10 ng) sollte nach dieser Zeit ein deutliches Signal ergeben.

Da die Strategie, die Fucosyltransferase V aus Einschlusskörperchen in die native Form rückzufalten nicht zu enzymatisch aktiven Protein führte, wurde ein zweiter Ansatz gewählt, bei dem die Fucosyltransferase V *in vivo* korrekt gefaltet werden sollte. Durch die Fusion mit dem *E. coli*-Protein MBP kann erreicht werden, daß sonst unlösliche Proteine löslich in der Zelle vorliegen (Maina *et al.*, 1988). So konnte gezeigt werden, daß eine GDP-Mannosyltransferase mit einem N-terminalen MBP-Fusionsteil löslich und funktionell aktiv in *E. coli* exprimiert werden kann (Muniz *et al.*, 2004). Da es sich beim MBP um ein periplasmatisches *E. coli*-Protein handelt, wird auch das Fusionsprotein in das Periplasma exportiert. Die dort herrschenden oxidativen Bedingungen unterstützen die Ausbildung der für die Faltung notwendigen Disulfidbrücken. Zusätzlich zur Vermittlung von Löslichkeit und korrekter Faltung dient der MBP-Fusionsanteil zur Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Amylosematrix.

Das MBP-FucT V Fusionsprotein wurde unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Dabei fand trotz Signalsequenz kein bzw. nur ein sehr geringer Transport ins Periplasma statt, so daß das rekombinante Protein aus einem Gesamtzellaufschluß über eine Amylosematrix gereinigt werden mußte. Nach der Reinigung konnte in den Elutionsfraktionen das Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 83 kDa detektiert werden. Zusätzlich wurden einige Proteine geringerer Masse von der Säule eluiert, die wahrscheinlich durch Translationsabbrüche entstanden sind und somit aber trotzdem an Amylose gebunden haben. Obwohl die Fucosyltransferase V als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* als vollständig lösliches Protein gebildet wurde, konnte kein enzymatischer Umsatz im Aktivitätstest detektiert werden, so daß auch hier die Frage offen bleibt, ob die Fucosyltransferase V in ihrer nativen Form vorliegt. Die Tatsache, daß das Fusionsprotein fast ausschließlich cytosolisch vorlag, indiziert, daß die für die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur essentiellen Disulfidbrücken nicht geschlossen wurden. Ein *in vitro* durchgeführtes *redox-shuffling* könnte zu einer nachträglichen Ausbildung korrekt verknüpfter Disulfidbrücken und somit zu aktivem Enzym führen.

Da eukaryotische Expressionssysteme in der Lage sind posttranslationale Modifikationen wie z.B. N-Glycosylierung durchzuführen, und die prokaryotische Expression in *E. coli* zu keiner aktiven Fucosyltransferase V führte, wurde das Enzym in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien exprimiert.

Für die heterologe Expression rekombinanter Protein stehen eine Vielzahl von unterschiedlichen eukaryotische Expressionssysteme zur Verfügung.

Hefen vereinen die Einfachheit der Handhabung und den niedrigen Materialaufwand prokaryotischer Expression mit der eukaryotischen Authentizität der Faltung und der postrationalen Modifikation der säugetierzell-basierenden Expressionssysteme. Authentische Glycostrukturen sind bei der Expression humaner Proteine aufgrund des hohen Ausmaßes an N-Hyper-Glycosylierung jedoch nicht zu erwarten.

Insektenzellen wurden vielfach für die Expression rekombinanter Fucosyltransferasen, insbesondere der Fucosyltransferase III, eingesetzt (Morais und Costa, 2003 und Morais *et al.*, 2001). Diese Zellen können sowohl durch Infektion mit rekombinanten Baculoviren als auch durch stabile Transfektion von Plasmiden für die rekombinante Expression humaner Glycoproteine genutzt werden. Der Expressionsapparat der Insektenzellen ist vergleichsweise nahe mit dem der höheren Eukaryonten verwandt, ihre Glycosylierungsmuster unterscheiden sich allerdings in gewissen Maßen (O'Reilly *et al.*, 1994). Seit einiger Zeit sind allerdings Insektenzelllinien auf dem Markt, die unterschiedliche Säugtierzell-Glycosyltransferasen stabil exprimieren und somit zu

einer säugetierzellähnlichen Glycosylierung der rekombinanten Proteine führen (Jarvis *et al.*, 1998). Durch die hohe Proliferation und die Verwendung starker viraler Promotoren, kann die Ausbeute an rekombinanten Protein die von Säugtierzellen bei weitem übertreffen.

Säugetierzellen sind für die homologe Expression rekombinanter Proteine der geeignetste Ansatz in Bezug auf posttranslationale Modifikationen und Prozessierung. Speziell die Glycosylierung ist weitestgehend authentisch. Säugtierzellen ermöglichen neben der guten Kultivierbarkeit und der hohen Transfektionseffizienz eine Kultivierung in serum-freiem Medium, was eine Reinigung des rekombinanten Proteins erleichtert.

Bislang konnte aktive Fucosyltransferase V sowohl in unterschiedlichen Säugtierzellen (de Vries *et al.*, 1995), Insektenzellen sowie in dem Schimmelpilz *Aspergillus niger var* (Murray *et al.*, 1996) exprimiert werden, wobei hier bestätigt wurde, daß eine Glycosylierung notwendig ist, aber diese nicht authentisch sein muß, da Insektenzellen zu einer von höheren Eukaryoten abweichenden Glycosylierung neigen (O'Reilly *et al.*, 1994).

In dieser Arbeit wurde die Fucosyltransferase V in HEK 293- und CHO-Zellen exprimiert und zur Sekretion mit der Signalsequenz des β -Trace-Proteins versehen. Diese Signalsequenz hat sich bereits bei der Expression der Fucosyltransferase III in unterschiedlichen Zelllinien als effektiv erwiesen (Morais *et al.*, 2001). Sowohl in den Kulturüberständen der transfizierten CHO-Zellen als auch in den Überständen der HEK 293-Zellen konnte die rekombinante Fucosyltransferase V im Immunoprint und mit Hilfe eines Aktivitätstests nachgewiesen werden. Die Menge an gebildetem Protein unterscheidet sich zwischen CHO- und HEK 293-Zellen bei gleicher Transfektionseffizienz um den Faktor 2, ist aber vergleichbar mit den für BHK- und COS-Zellen beschriebenen Ausbeuten (Christensen *et al.*, 2000a und de Vries *et al.*, 1995).

Das apparente Laufverhalten ist mit 90 und 88 kDa doppelt so hoch wie der zu erwartende Wert und ist begründet in der Dimerisierung dieses Fucosyltransferase V-Konstruktes. Durch Reduktion wurde die monomere Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 44 kDa erhalten. Hinsichtlich der Laufhöhe und der Homogenität der gebildeten Fucosyltransferase V unterscheiden sich die CHO-Zellen stark von den HEK 293-Zellen. Das von den CHO-Zellen gebildete Fucosyltransferase V-Dimer hat ein um 1-2 kDa höheres apparentes Laufverhalten als das von den HEK 293-Zellen gebildete Protein, was wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Glycosylierung zurückzuführen ist. Deutlicher wird der Unterschied bei der Analyse der reduzierten Formen. Die von den HEK 293-Zellen gebildete Fucosyltransferase V erscheint im Immunoprint als Doppelbande, während das von den CHO-Zellen gebildete Protein als singuläre Bande erscheint, die der schwereren Bande der HEK 293-

Zellen-Expression entspricht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich das von den HEK 293-Zellen gebildete Dimer aus einer schweren und einer leichten Fucosyltransferase V zusammensetzt, deren Masseunterschiede sich erst in der reduzierten monomeren Form bemerkbar machen. CHO-Zellen dagegen scheinen nur eine einzige Form der Fucosyltransferase V zu exprimieren, die auch in der monomeren Form als singuläre Bande erscheint.

Die Bildung von Dimeren ist bei Glycosyltransferasen ein häufig beobachtetes Phänomen. So wird die Fucosyltransferase V auch dann als Dimer exprimiert, wenn die cytoplasmatische und die transmembrane Domäne enthalten sind (Christensen *et al.*, 2000b), so daß davon ausgegangen werden kann, daß dieser Effekt nicht auf die Deletion dieser Proteindomänen zurückzuführen ist. Dennoch ist unklar, welche Cysteine im Protein für die Dimerisierung verantwortlich sind.

Die rekombinante Expression einer löslichen und aktiven Form der Fucosyltransferase V konnte durch die Verwendung von Säugetierzellen verwirklicht werden und zeigt die Überlegenheit eines eukaryotischen Expressionssystem gegenüber der Expression in *E. coli*. Die Verwendung von Säugetierzellen allerdings ist limitiert durch die geringen Ausbeuten an rekombinantem Protein und somit hinsichtlich einer strukturellen Untersuchung des Enzyms nicht geeignet.

Insektenzellen versprechen durch die Verwendung stärkerer Promotoren und durch stärkere Proliferation höhere Ausbeuten an rekombinantem Protein. Drei unterschiedliche Strategien zur Expression von rekombinanter Fucosyltransferase V in Insektenzellen wurden hinsichtlich ihrer Effizienz und Ausbeute miteinander verglichen. Durch diesen Vergleich sollte evaluiert werden, welche Strategie für die Expression der rekombinanten Fucosyltransferase V hinsichtlich struktureller Untersuchungen am geeignetesten ist. In zwei Ansätzen wurde das rekombinante Protein mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystem exprimiert, wobei evaluiert werden sollte, inwieweit die Verwendung unterschiedlich starker Promotoren Einfluß auf die gebildete Proteinmenge hat. Sowohl der Polyhedrinpromotor als auch der p10-Promotor werden in der sehr späten Phase der viralen Replikation aktiv, wobei der p10-Promotor als etwas schwächer beschrieben ist (Roelvink *et al.*, 1992). Besonders stellte sich hier die Frage, ob die Expression zeitlich durch die virusbedingte Lyse der Zellen terminiert wird, oder ob es durch die Überexpression der Fucosyltransferase V zu einem vorzeitigen Zusammenbruch der Proteinfaltungsmaschinerie und des sekretorischen Weges kommt. Schwächere Promotoren könnten, im letzteren Fall, für eine Verlängerung der Expression sorgen, und damit im Endeffekt die Proteinausbeute erhöhen. Im dritten Ansatz wurde die rekombinante Fucosyltransferase V in stabil transfizierten Insektenzellen exprimiert. Diese kon-

tinuierliche Expression hat den Vorteil, daß die Zellen über einen sehr langen Zeitraum Protein produzieren und somit die Ausbeute stark erhöht wird.

Durch die Infektion von BTI-TN-5B1-4-Zellen, einer Zelllinie aus *Trichoplusia ni*, mit rekombinanten Baculoviren konnte die Fucosyltransferase V exprimiert und im Überstand nachgewiesen werden. Die Ausbeute an rekombinantem Protein war jedoch in hohem Maße von der eingesetzten Virusmenge und dem verwendeten Promotor abhängig. Erst bei einer MOI von 5 und unter Verwendung des Polyhedrinpromotors, wurde die Fucosyltransferase V in einem signifikant höheren Maße, als in Säugetierzellen exprimiert. Bei geringen MOIs war die Expressionsrate niedrig und es konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen festgestellt werden.

Hinsichtlich der eingesetzten Virusmenge entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen, da eine konzentrierte Infektion möglichst aller Zellen nur durch einen hohen Überschuß an Virus zu gewährleisten ist. Die deutliche Überlegenheit des Polyhedrinpromotors gegenüber dem schwächeren p10-Promotor war jedoch so nicht vorherzusagen.

Die Expression der Fucosyltransferase III mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems führt zu einer massiven Anreicherung misgefalteten Proteins im endoplasmatischen Retikulum und damit zum Zusammenbrechen der Proteinsekretion schon am dritten Tag nach der Infektion (Morais *et al.*, 2001). Ein schwächerer Promotor wie der p10-Promotor sollte durch die geringere Transkription ein Zusammenbrechen der Proteinprozessierung verzögern bzw. verhindern können und damit im Endeffekt zu höheren Proteinausbeuten führen (DiFalco *et al.*, 1997 und Pajot-Augy *et al.*, 1999). Es ist jedoch deutlich erkennbar, daß, unabhängig vom eingesetzten Promotor, am dritten Tag nach der Infektion die Zellproliferation stark nachläßt und die Fucosyltransferase-Aktivität im Überstand ein konstantes Niveau erreicht. Der Auftrag der Zellvitalität gegenüber der Gesamtzellzahl macht deutlich, daß sich zu diesem Zeitpunkt die Zellen in der sehr späten Phase der Virusreplikation befinden und schon nach 72 h zu einem großen Teil tot sind (Harrap, 1972). Diese Ergebnisse indizieren, daß, unabhängig vom eingesetzten Promotor, die Fähigkeit zur Proteinsekretion und Expression aufgrund der virusbedingten Lyse der Zellen in der sehr späten Phase der Replikation nachläßt. Die Verwendung schwächerer Promotoren wie des p10-Promotor läßt nur dann einen Vorteil erwarten, wenn es aufgrund der extremen Überproduktion an rekombinantem Protein zu einem vorzeitigem Zusammenbruch des zellulären Faltungsapparates kommt (DiFalco *et al.*, 1997 und Pajot-Augy *et al.*, 1999). Auch die Verwendung von Promotoren, die zu einem früheren Zeitpunkt während der Virusreplikation aktiv sind, würde in einem solchen Fall die Ausbeute an Protein erhöhen, obwohl diese Promotoren in der Regel deutlich schwächer sind als die Promotoren der

sehr späten Phase (Thiem und Miller, 1990).

Die stabile Expression der Fucosyltransferase V in Insektenzellen erfolgte unter Verwendung des *Insect Select Systems*, bei dem stabil transfizierte Insektenzellen durch die Selektion mit Blasticidin erhalten werden. Nach der Transfektion konnte nach zwei Wochen eine stabile Zelllinie etabliert und die Fucosyltransferase V im Überstand detektiert werden.

Das Laufverhalten der in Insektenzellen exprimierten Fucosyltransferase V in der SDS-PAGE entspricht weitestgehend dem der Säugetierzellexpression. Die Fucosyltransferase V wird größtenteils als Dimer mit einem apparenten Molekulargewicht von 86 kDa exprimiert und hat damit ein 2–3 kDa geringeres Molekulargewicht als das Protein aus den HEK 293-Zellen. Zusätzlich zu der dimeren Form ist hier jedoch eine monomere Form zu detektieren, die sich im Gegensatz zur singulären Bande bei den CHO-Zellen und der Doppelbande bei der Expression in HEK-Zellen in eine Tripelbande aufspaltet. Reduktion der singulären Dimerbande führt zur identischen Aufspaltung in drei unterschiedlich schwere monomere Fucosyltransferase V-Formen.

Die Ausbeute an rekombinantem Protein beträgt für die Baculovirus induzierte Expression 1–2 mg/l und für die stabile Expression 10–12 mg/l. Die deutlich höhere Ausbeute an gebildetem aktivem Enzym und die einfachere Handhabung macht diese Expressionsmethode für die Herstellung der rekombinanten Fucosyltransferase V in Insektenzellen allen anderen Methoden überlegen. Die Verwendung großvolumiger Suspensionskulturen läßt es zu, die Fucosyltransferase V in sehr großen Maßstäben herzustellen und für strukturelle Untersuchungen, sowie den Einsatz in der enzymatische Synthese schwer zugänglicher Zuckerstrukturen zu nutzen. Desweiteren könnte die Ausbeute weiter erhöht werden, wenn durch Vereinzelung der stabilisierten Zellen die interzelluläre Varianz aufgehoben wird und eine monoklonale Zelllinie generiert werden würde.

Die Reinigung der rekombinanten Fucosyltransferase V erfolgte über eine Kombination von Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie. Als Affinitätsmatrix wurde GDP-Affigel verwendet, das durch seine hohe Affinität zu unterschiedlichen Fucosyltransferasen geeignet ist, diese spezifisch zu binden, gleichzeitig aber eine schonende kompetitive Elution mit freiem GDP zuläßt. Das immobilisierte GDP erwies sich dabei als zugänglich sowohl für die dimere als auch für die monomere Form der Fucosyltransferase V und resultierte in einer Koreinigung beider Spezies. Ein Unterschied im Bindungsverhalten konnte nicht festgestellt werden. Der limitierende Faktor dieses Reinigungsschrittes ist die geringe Kapazität der eingesetzten Matrix, sowie die geringe Haltbarkeit. Lediglich 25 µg rekombinante Fucosyltransferase V konnten pro ml Säulenmatrix gebunden werden und diese Kapazität

nahm im Laufe weniger Wochen stark ab. Eine alternative Affinitätsreinigung über andere spezifische Liganden oder Einführung eines Affinitätstags scheint daher notwendig zu sein, um ausreichende Menge an rekombinantes Protein zu reinigen. Die Elution mit freiem GDP, einem Inhibitor der Fucosyltransferase V, stellt eine weitere Problematik dieser Reinigungsmethode dar, denn für funktionelle Untersuchungen muß diese Substanz komplett entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Kationentauscher-Chromatographie gewählt, die es erlaubt restliche Verunreinigungen sowie das GDP von der Fucosyltransferase V zu trennen. Allgemein ist zu sagen, daß diese Methode zu einem Protein führt, daß mit 90 % Reinheit vorliegt und aufgrund seines einfachen Aufbaus zu geringen Verlusten führt.

5.2 Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen

Die Expression des vorliegenden Konstruktes führte sowohl in CHO- und HEK-Zellen als auch in BTI-TN-5B1-4-Zellen zur Ausbildung eines überwiegenden Anteils an Dimeren. Diese Dimere erscheinen im Immunoprint als singuläre Bande und lassen sich mit 1 mM DTT zu Monomeren reduzieren. Durch die Reduktion erscheint die Fucosyltransferase V in der SDS-PAGE als Doppelbande (HEK 293-Zellen) bzw. als Tripelbande (BTI-TN-5B1-4-Zellen). Ausschließlich in CHO-Zellen erscheint die Fucosyltransferase V als singuläre Bande, wenn sie mit reduzierenden Agentien behandelt wurde. Sowohl die Dimere als auch die Monomere binden an GDP und sind funktionell aktiv. Durch ortsspezifische Mutagenese konnte gezeigt werden, daß ausschließlich das Cys64 für die Dimerisierung in dem in dieser Arbeit exprimierten Konstrukt verantwortlich ist.

Die Dimerisierung von Glycosyltransferasen über definierte Disulfidbrücken ist ein beschriebenes Phänomen. So führt auch die Expression der nicht deletierten Fucosyltransferase V in COS-Zellen zu einem geringen Maße zur Ausbildung von Dimeren (Christensen *et al.*, 2000a). Dimere Formen von Glycosyltransferasen sind unter anderem für die β -Galactosid- α -2,6-Sialyltransferase (Ma und Colley, 1996), die *Core 1* β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase und die Fucosyltransferase I beschrieben (El-Battari *et al.*, 2003). Die Bedeutung dieser Dimerisierung ist bis heute unklar, scheint aber eine Rolle bei der Regulierung der Aktivität und bei der Sekretion zu spielen. Am besten untersucht sind diese Mechanismen bei der β -Galactosid- α -2,6-Sialyltransferase. Dieses Enzym dimerisiert im endoplasmatischen Retikulum und weist als Dimer nur eingeschränkte Aktivität auf, ist jedoch weiter in der Lage sein Substrat Galactose zu binden. Das für die Dimerisierung verantwortliche Cystein (Cys24)

in der β -Galactosid- α -2,6-Sialyltransferase liegt in der Transmembrandomäne und andere Cysteine scheinen keine Rolle bei der Dimerisierung zu spielen. Bei der Fucosyltransferase I scheint die Dimerisierung einen Einfluß auf die Sekretion des Enzyms zu haben. Im Golgi-Apparat liegen sowohl dimere als auch monomere Formen des Proteins vor, während ausschließlich das Dimer sekretiert wird. Im Gegensatz zur β -Galactosid- α -2,6-Sialyltransferase sind aber beide Formen enzymatisch aktiv (Qian *et al.*, 2001).

Die rekombinanten Fucosyltransferase V-Dimere lassen sich durch Behandlung mit 1 mM DTT reduktiv spalten, wobei es zu einem leichten Anstieg der Aktivität kommt. Hypothetisch ist dieser Anstieg durch die partielle Oxydation des ungebundenen Cys156 während der Proteinpräparation zu erklären, welches durch DTT wieder in eine freie Sulfhydryl-Gruppe reduziert wird. Eine freie Sulfhydryl-Gruppe ist essentiell für die Bindung von GDP-Fucose (Holmes *et al.*, 1995).

Inwieweit die in dieser Arbeit beobachtete Dimerisierung der Fucosyltransferase V ihrem nativem Verhalten entspricht, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Das Maß der Dimerisierung, wie es bei der Expression des nicht verkürzten Enzyms in COS-Zellen auftritt, ist signifikant geringer als der in dieser Arbeit beobachtete Anteil (Christensen *et al.*, 2000a). Die Gründe dafür könnten in der leichteren Zugänglichkeit des Cys64 liegen, da dieses durch die Deletion von Teilen der *Stem*-Region, der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne sehr nahe am N-Terminus des vorliegenden Konstruktes liegt. Durch diese Zugänglichkeit kann die Bildung von Dimeren im endoplasmatischen Retikulum stark bevorzugt werden. Weiterhin ist unklar, ob das Cys64 die einzige Aminosäure ist, die *in vivo* für die Dimerbildung verantwortlich ist, da durch die Verkürzung zwei weitere Cysteine in diesem Konstrukt fehlen, deren Einfluß nicht untersucht wurde. Für weitere Untersuchungen ist es deshalb unbedingt notwendig, die Fucosyltransferase V als nicht deletiertes Protein in unterschiedliche Zelllinien zu exprimieren und weitere Mutationsstudien durchzuführen, um die Mechanismen und die biologische Bedeutung der Dimerisierung aufzuklären.

Die spezifische Aktivität aller exprimierten Mutanten entspricht der, des Wild-Typ-Enzyms. Der Wert von 0,37 mmol/(mg Enzym \times min) liegt nahe an dem Literaturwert von 0,88 mmol/(mg Enzym \times min) (Murray *et al.*, 1996). Das Cys64 liegt in der *Stem*-Region und es ist deshalb nicht verwunderlich, daß die Veränderung dieser Aminosäure keinen Einfluß auf die Funktion der Fucosyltransferase V hat.

Lepidopterane Insektenzellen, wie die hier verwendeten Zellen von *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 bilden N-Glycane, die in der Regel aus dem Pentasaccharid Man₃GlcNAc₂ bestehen. Die Reaktion mit dem Lektin *Galanthus*

nivalis Agglutinin (GNA) bestätigt die Dominanz endständiger Mannosereste (Shibuya *et al.*, 1988). Diese Grundstruktur wird von Insektenzellen nur in geringem Maße verändert.

Endständige Sialinsäuren, wie sie von den Lektinen *Sambucus nigra Agglutinin* (SNA) und *Maackia amurensis Agglutinin* (MAA) erkannt werden (Shibuya *et al.*, 1987 und Wang und Cummings, 1988), konnten mit Hilfe von Lektinen auf einer Phosphatase, die rekombinant in *T. ni*-Zellen produziert wurde, nachgewiesen werden. Diese Modifikation des Core-Pentasaccharides scheint jedoch äußerst selten zu sein, und die Analyse der Zuckerstrukturen des gleichen Proteins mit Hilfe anderer Methoden wie Elektrophoretische Analyse Fluoreszenz-markierter Glycoproteine konnten die Anwesenheit von Sialinsäure nicht bestätigen (Kulakosky *et al.*, 1998b). Das Fehlen jeglicher Reaktivität der Lektine MAA und SNA gegenüber rekombinanter Fucosyltransferase V bestätigt diese Beobachtungen.

Ein gewisser Anteil von Glycanen von IgG, die in *T. ni*-Zellen exprimiert wurden, war mit endständiger Gal β 1-4GlcNAc besetzt und konnte mit dem Lektin *Datura stramonium Agglutinin* (DSA) nachgewiesen werden (Hsu *et al.*, 1997). Dies ist jedoch ein äußerst seltenes Beispiel dafür, daß diese LacNAc-Zuckerstruktur in lepidopteranen Insektenzellen beobachtet wurde (Kulakosky *et al.*, 1998a). In diesem Zusammenhang ist auch das Fehlen jeglicher Reaktivität der Lektine DSA gegenüber rekombinanter Fucosyltransferase V eine Bestätigung der Literaturangaben.

Die Änderung des Laufverhaltens der Fucosyltransferase V nach Behandlung mit N-Glycosidase F zeigt die Anwesenheit Asparagin-verknüpfter Oligosaccharide. Die zumindest partielle Abspaltung dieser Zuckerstrukturen führt zu einer Verringerung der Heterogenität und deutet darauf hin, daß die unterschiedlichen apparenten Molekulargewichte der drei monomeren Formen der Fucosyltransferase V durch die unterschiedliche Glycosylierung bedingt sind. Eine vollständige Deglycosylierung mit N-Glycosidase F von in Insektenzellen exprimierten Glycoproteinen ist in vielen Fällen nicht möglich, da durch die Bindung von Fucose an die C3-Hydroxylgruppe des Asparagin gebundenen GlcNAc die N-Glycosidase F nicht mehr in der Lage ist, das rekombinante Protein zu deglycosylieren (Tretter *et al.*, 1991). Die hier verwendete *T. ni* Zelllinie BTI-TN-5B1-4 fucosyliert ca. 18 % der sekretierten rekombinanten Proteine (Hsu *et al.*, 1997), wobei der Anteil dieser Zuckerstrukturen bei der Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems deutlich geringer sein kann (van Die *et al.*, 1996).

Die genaue Zusammensetzung der N-Glycane der in BTI-TN-5B1-4-Zellen exprimierten Fucosyltransferase V ist mit den angewandten Methoden nicht aufzuklären. Die Verwendung unterschiedlicher Lektine bestätigte jedoch die

relativ strukturarme Glycosylierung von Insektenzellen und zeigte, daß ausschließlich *High*-Mannose Strukturen vorhanden sind. Obwohl Insektenzellen in Ausnahmefällen durchaus in der Lage sind, komplexere Strukturen mit 1,3-fucosylierten oder sialierten Glycanen zu bilden entspricht die beobachtete Reaktivität der unterschiedlichen Lektine der Erwartung. Somit ist die stark ausgeprägte Heterogenität nicht auf die Ausbildung unterschiedlicher Glycanstrukturen zurückzuführen. Die in Insektenzellen häufig beobachtete Hypoglycosylierung (Voss *et al.*, 1993 und Walravens *et al.*, 1996) kann jedoch die beobachtete Heterogenität erklären. Für eine endgültige Klärung sind jedoch weitere Studien nötig. Insbesondere wäre es von großem Interesse, ob alle im Immunoprint detektierbaren Banden Glycanstrukturen aufweisen und ob eventuell ein Anteil nichtglycosylierter Fucosyltransferase V im Expressionsüberstand existiert. Weitere Untersuchungen könnten klären, inwieweit die Glycosylierung für die Ausbildung voller enzymatischer Aktivität notwendig ist. Mutationsstudien an den putativen N-Glycosylierungsstellen könnten Wege aufzeigen, die Fucosyltransferase V in großer Homogenität zu exprimieren und so durch kristallographische Verfahren die Struktur dieses überaus interessanten Proteins aufzuklären.

5.3 Darstellung von peptidischen Liganden gegen die Fucosyltransferase V aus kombinatorischen Bibliotheken

Die Verwendung von Peptiden als Therapeutika hat gegenüber anderen Substanzklassen einige entscheidende Vorteile. Die Nutzung vollständig degenerierter Peptid-Bibliotheken, welche bis zu 10^{10} unterschiedliche Peptide beinhalten können, ermöglicht die Entwicklung von unterschiedlichsten Liganden biologisch relevanter Proteine in sehr kurzer Zeit. Dabei werden Peptide generiert, die hohe Affinitäten und Spezifitäten aufweisen und so Protein-Protein Interaktionen unterbinden oder Enzyme inhibieren können. Gegenüber anderen als Therapeutika eingesetzten Proteinen wie z.B. Antikörpern oder Antikörperfragmenten weisen Peptide eine Vielzahl von Vorteilen auf (Stockwin und Holmes, 2003). Peptide sind stabiler als Proteine und weisen meist eine geringere Toxizität auf. Auch erweisen sich Peptide als nicht immunogen und können in deutlich höheren Dosen verabreicht werden. Nicht zuletzt sind die Herstellungskosten synthetischer Peptide geringer als die von rekombinanten Antikörper oder anderen Proteinen.

Gegenüber kleinen Molekülen als Therapeutika weisen Peptide jedoch eine Vielzahl von Nachteilen auf. Peptide sind generell ebenso wie Proteine von

Proteasen im Serum hydrolysierbar. Die Bioverfügbarkeit kann bei vielen Peptiden aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit deutlich herabgesetzt sein, da sie schnell ausgeschieden werden und/oder schlecht aufgenommen werden. Die meisten Peptide sind nicht oral zu verabreichen, da sie im Magen oder Darm abgebaut werden. Viele von diesen Problemen können jedoch durch den Einsatz von Peptidomimetika umgangen werden. Bei Peptidomimetika handelt es sich um modifizierte Peptide, die durch Veränderungen in den Seitenketten oder der Verwendung von D-Aminosäuren eine höhere Bioverfügbarkeit erlangen oder langsamer abgebaut werden (Giannis und Kolter, 1993).

Alle Ansätze zur Identifizierung potenter Fucosyltransferase-Inhibitoren basieren auf der Modifikation von Substraten oder dem Design von Übergangszustandsanaloga (Bella und Kim, 1971, Cai *et al.*, 1992, Murray *et al.*, 1997 und Wong *et al.*, 1992). Kombinatorische Verfahren, wie sie durch vollständig degenerierte Peptid-Bibliotheken repräsentiert werden, stellen einen differenteren Ansatz da, Liganden bzw. Inhibitoren der Fucosyltransferase V zu entwickeln. Die Verwendung von sowohl linearen als auch zirkularen Hepta-Peptid-Bibliotheken ermöglichte Bereits die Identifizierung potenter Inhibitoren gegen β -Lactamase (Huang *et al.*, 2003), Proteinasen (Koivunen *et al.*, 1999) oder Trombin (Meiring *et al.*, 2002).

Die Verwendung vollständig degenerierte Heptapeptid-Bibliotheken ermöglicht bei einem Einsatz von 2×10^{11} Phagen die Ausnutzung der vollen Diversität der Bibliothek ($1,2 \times 10^9$). Größere Bibliotheken haben dagegen den Nachteil, daß durch die limitierte Phagenmenge die Gesamtdiversität unter Umständen nicht erhalten werden kann. Der Einsatz von sowohl einer linearen Bibliothek als auch von zirkulären Peptiden ermöglicht einen direkten Vergleich dieser Ansätze. Lineare Peptide haben eventuell den Vorteil, daß sie durch ihre höhere Flexibilität eher in eine Bindungstasche hineinpassen können. Zirkuläre Peptide sind dagegen unflexibler und können daher eine stärkere Bindung eingehen.

Für die Immobilisierung wurde zumindest in den ersten beiden Selektionsrunden das Biotin-Streptavidin-System genutzt. In Hinblick auf die Selektion inhibitorisch wirksamer Peptide ist die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums von entscheidender Bedeutung. Durch die Verwendung des relativ kleinen Biotin-Moleküls und der Selektion in Lösung bestand die Möglichkeit, daß zumindest ein Teil der aktiven Zentren für den Phagen zugänglich sind. Da durch die Verwendung von Streptavidin die Möglichkeit bestand, ausschließlich bindende Phagen gegen dieses Protein zu selektieren, wurde in der dritten Runde auf die Verwendung von Streptavidin verzichtet und die Fucosyltransferase V kovalent an eine Epoxy-funktionalisierte Polystyroloberfläche gekoppelt.

Die Selektion der linearen Heptabibliothek gegen die Fucosyltransferase V

führte zu einer Anreicherung bindender Phagen, die sich als kreuzreaktiv mit dem Referenzprotein DHFR erwiesen. Die Klone wurden nicht weiter untersucht, da die hohe Kreuzreaktivität auf eine geringe Spezifität schließen läßt. Die Tatsache, daß nur ein Drittel der untersuchten Klone eine Reaktivität in der ELISA-Analyse zeigte ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die lineare Bibliothek nicht geeignet ist um auf diese Weise eine Vielzahl von spezifisch bindenden Peptiden zu selektieren.

Die Selektion der zirkulären Heptapeptid-Bibliothek führte zu einer vollständigen Anreicherung die Fucosyltransferase V spezifisch bindender Phagen. Von 18 der sequenzierten Klone wiesen dreizehn unterschiedliche Sequenzen auf, die alle sehr ähnlich der Konsensussequenz CSPGMNWLC waren. Die Aminosäureabfolge CSPX₁MX₂WLC erwies sich dabei als hochkonserviert, so daß man annehmen kann, daß diese Aminosäuren in der Wechselwirkung mit der Fucosyltransferase V eine bedeutende Rolle spielen.

Die Bindung des synthetischen Peptids CSPGMNWLC an die Fucosyltransferase V konnte mit Hilfe der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) gezeigt werden, zeigte jedoch im Aktivitätstest keine inhibitorische Wirkung.

Die Selektion von Peptid-Bibliotheken gegen die Fucosyltransferase V führte also nicht wie erhofft zur Identifizierung inhibitorischer Peptide, sondern ausschließlich zu Liganden, die keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der Fucosyltransferase V haben. Durch die hier angewandte Selektionsstrategie wurde weder die Bindung im Reaktionszentrums des Enzyms bevorzugt, noch konnte durch die Verwendung von Fucosyltransferase V-Inhibitoren eine kompetitive Elution der Phagen erzielt werden. Desweiteren besteht die Möglichkeit, daß der überwiegende Anteil an Fucosyltransferase V-Dimeren zu einer weiteren Abschirmung der relevanten Proteinregionen führte.

Trotz der fehlenden inhibitorischen Wirkung des synthetisierten Peptids stellt dieses einen Liganden der Fucosyltransferase V dar und kann für unterschiedliche Applikationen eingesetzt werden. Die geringe Kapazität der GDP-Affinitätsmatrix sowie die Verwendung von GDP zur Elution kann bei der Reinigung der Fucosyltransferase V umgangen werden, wenn mit Hilfe des selektierten Peptides eine Affinitätsreinigungsstrategie etabliert werden würde.

Für die Entwicklung von inhibitorisch wirkenden Peptiden ist es notwendig, die Selektionsstrategie zu verfeinern und dafür zu sorgen, daß bevorzugt solche Phagen selektiert werden, die mit dem aktiven Zentrum des Enzyms wechselwirken. Das kann unter anderem dadurch erreicht werden, daß der hier entwickelte Peptidligand für die gerichtete Immobilisierung der Fucosyltransferase V verwendet wird und so nur irrelevante Bereiche des Proteins abgeschirmt werden.

5.4 Ausblick

Für eine weiterführende strukturelle Charakterisierung der rekombinanten Fucosyltransferase V ist es notwendig Dimerbildung und Inhomogenität bezüglich der Zuckerstrukturen weitestgehend auszuschließen. Zu diesem Zweck sollte das Konstrukt am N-Terminus so weit verkürzt werden, daß sowohl das Cys64 als auch die putative Glycosylierungstellen Asn60 nicht mehr exprimiert werden. Hinsichtlich der Expressionsrate ist der in dieser Arbeit entwickelte Ansatz, das Enzym stabil in Insektenzellen zu exprimieren, eine deutliche Verbesserung gegenüber bereits beschriebenen Expressionsansätzen, deren Ausbeuten nicht über 2 mg/l lagen. Die Menge an rekombinantem Protein von 10–12 mg/l Expressionsüberstand und die unproblematische Reinigung macht das Enzym für kristallographische Untersuchungen zugänglich.

Der Austausch des Cys156 gegen Ser führte in den Mutanten C156S und C64S/C156S zu keiner signifikanten Änderung der enzymatischen Aktivität. Die Behandlung mit dem Sulfhydryl-modifizierenden Agens N-Ethylmaleimid (NEM) führt jedoch zu einer Inaktivierung der Fucosyltransferase V und Fucosyltransferase III (Holmes *et al.*, 1995), sowie der Fucosyltransferase VI (Mollicone *et al.*, 1990). Diese Inaktivierung ist bedingt durch die Alkylierung konservierter Cysteinreste in dem Proteinbereich, der für die GDP-Fucose-Bindung verantwortlich ist und kann sowohl durch GDP, als auch durch GDP-Fucose inhibiert werden. Die Fucosyltransferase IV und die Fucosyltransferase VII dagegen weisen diese Cysteinreste nicht auf und können durch NEM auch nicht inaktiviert werden (Holmes *et al.*, 1985). Der Austausch des Ser178 gegen Cys in der Fucosyltransferase IV verändert im Enzym weder die Substratspezifität noch führt es zu einer signifikanten Veränderung in der enzymatischen Aktivität. Durch die Mutation ist aus der NEM-insensitiven Fucosyltransferase IV jedoch ein Enzym geworden, daß durch alkylierende Substanzen inaktiviert werden kann. Auch hier ist die Inaktivierung abhängig von der Anwesenheit von GDP-Fucose (Holmes *et al.*, 1995).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutation des Cys156 gegen Ser in der Fucosyltransferase V läßt den Schluß zu, daß das konservierte Cys156, wenn es alkyliert wird, die Bindung von GDP-Fucose verhindert. Ein Austausch gegen Serin führt jedoch zu keiner signifikanten Änderung der enzymatischen Eigenschaften. Neben der hier bestimmten spezifischen Aktivität der unterschiedlichen Konstrukte ist es jedoch unerläßlich auch die Bindungseigenschaften der unterschiedlichen Substrate zu bestimmen, um so Aussagen über die Bedeutung des Cys156 zu machen.

Die hohe Ausbeute an rekombinanten Protein ermöglicht die Bindungseigenschaften der einzelnen Substrate zu untersuchen. Durch 1D *Saturation Trans-*

fer *Difference* (STD) NMR Experimente (Meyer und Peters, 2003) konnte die Bindungskonformation von UDP-Galactose in der Bindungstasche einer Galactosyltransferase bestimmt werden und damit Information über den Reaktionsmechanismus gewonnen werden (Jayalakshmi *et al.*, 2004). Ähnliche Messungen mit der rekombinanten Fucosyltransferase V erlauben tiefere Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Protein und so eventuell die Optimierung bereits existierender Fucosyltransferase-Inhibitoren. Zusätzlich kann durch Vergleiche der Mutante C156S mit dem Wild-Typ-Enzym die Bedeutung des konservierten Cysteins bei der Bindung von GDP-Fucose aufgeklärt werden. Insbesondere im Bezug auf die Austauschbarkeit dieser Aminosäure gegen Serin können wichtige Erkenntnisse über die Bindung und den Reaktionsmechanismus gewonnen werden.

Für die Entwicklung von Fucosyltransferase-Inhibitoren mit Hilfe kombinatorischer Verfahren ist es unerlässlich, die Selektion von Peptid-Bibliotheken gegen die Fucosyltransferase V zu optimieren. In erster Linie ist die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums durch Reduktion der Dimere zu Monomeren zu gewährleisten. Auch die kompetitive Elution mit Hilfe von Inhibitoren oder Substraten ist ein vielversprechender Ansatz um Phagen zu selektieren, die im aktiven Zentrum des Enzyms binden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Studien zur rekombinanten Expression der humanen Fucosyltransferase V durchgeführt werden. Die Fucosyltransferase V katalysiert den Transfer von L-Fucopyranose von GDP-Fucose zum Akzeptor-Substrat N-Acetyllactosamin und ist somit an der Bildung von Le^x Trisacchariden beteiligt. Da es sich bei dem Protein um ein Typ II Transmembranprotein handelt, wurde der cytoplasmatische und der transmembrane Bereich sowie ein Teil der Stenregion deletiert. In *E. coli* wurde die Fucosyltransferase V als „His-Tag“-Fusionsprotein exprimiert und aus dem Zellysat isoliert. Die Expression in Prokaryoten führte zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate, die sich nur in sehr geringem Maße *in vitro* rückfalten ließen. Die N-terminale Fusion mit dem *E. coli*-MB-Protein führte zur Bildung von löslichem Protein. Alle in *E. coli* dargestellten Fucosyltransferase-Konstrukte zeigten keine enzymatische Aktivität.

In eukaryotischen Zellen konnte die Fucosyltransferase V fusioniert mit der Signalsequenz des β -Trace-Proteins sekretorisch exprimiert werden. Die mammalen Zelllinien CHO und HEK 293 ergaben Ausbeuten von 0,2–1 mg/l. Die Insektenzelllinie BTI-TN-5B1-4 aus *Trichoplusia ni* lieferten unter Verwendung des Baculovirus Expressionssystems 1–2 mg rekombinante Fucosyltransferase V. Die Verwendung stabil transfizierter *Trichoplusia ni*-Zellen führte sogar zu Ausbeuten von 10–12 mg/l.

Fucosyltransferase V, die in eukaryotischen Zelllinien hergestellt wurde, erwies sich als enzymatisch aktiv und lag zu einem großen Anteil als Dimer vor. Die dimere Form wurde durch Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken gebildet und ließ sich unter Erhalt der enzymatischen Aktivität mit einer Konzentration von 1 mM DTT in eine monomere Form reduzieren. Mutationsstudien an zwei unterschiedlichen Cystein-Resten konnten zeigen, daß das Cys64 verantwortlich für die Bildung der Dimere ist. Das an der GDP-Fucose-Bindung beteiligte Cys156 konnte ohne Verlust der enzymatischen Aktivität gegen Serin ausgetauscht werden.

Die in eukaryotischen Zellen exprimierte Fucosyltransferase V ist glycosyliert und weist ein hohes Maß an Heterogenität auf. Deglycosylierung mit N-Glycosidase F führte zu einer Verringerung des apparenten Molekulargewichtes und zu einer Fokussierung der Banden im SDS-PAGE. Analysen mit spezifisch bindenden Lektinen zeigten bei der in Insektenzellen exprimierten Fucosyltransferase V eine dominierende Präsenz von „high-Mannose“ N-Glycanen.

Zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren gegen die Fucosyltransferase V wurden auf Phagen präsentierte Heptapeptid-Bibliotheken gegen das rekomb-

Zusammenfassung

binante Protein selektiert. Die Verwendung einer Bibliothek zirkularisierter Peptide führte zur Selektion eines spezifischen Liganden der rekombinanten Fucosyltransferase V, welcher keine inhibitorische Wirkung auf das Enzym aufwies.

7 Summary

The aim of this study was to establish different methods for recombinant expression of the human fucosyltransferase V in eukaryotic and prokaryotic cell lines. The fucosyltransferase V catalyses the transfer of fucose from the nucleotide donor sugar GDP-fucose to the acceptor-substrate N-acetyl-lactoseamine and takes part in the biosynthesis of Le^x and sLe^x structures.

The enzyme is a type II transmembrane protein. To produce a soluble form of the protein, a truncated form lacking the cytoplasmic-, the transmembrane- and a part of the stem-region was cloned and expressed in different expression systems. In *E. coli*-cells the fucosyltransferase was expressed as a “his-tag”-fusion-protein and isolated from the cell lysate. The recombinant protein was insoluble and could only be refolded in very small amounts. The expression of a MBP-FucT V fusion-protein resulted in a formation of soluble enzyme. None of the different FucT V constructs expressed in *E. coli* showed enzymatic activity.

To produce the fucosyltransferase in eucaryotic cell lines the protein was fused to the signal-sequence of the human β -trace protein. The mamalian cell lines CHO and HEK 293 expressed the protein with an amount of 0.2–1 mg/l. The insect cell line BTI-TN-5B1-4 from *Trichoplusia ni* produced 1 mg/l fucosyltransferase V using recombinant baculoviruses. Stable transected BTITN-5B1-4-cells expressed the protein with an amount of 10–12 mg/l.

fucosyltransferase V produced in eukaryotic cells was active and a great proportion was expressed in a dimeric form. The intermolecular disulfide-bridges forming the dimers could be reduced to a monomeric form with DTT in a concentration of 1 mM retaining full enzymatic activity. Site directed mutagenesis changing different cysteine-residues to serin showed that Cys64 is responsible for forming intermolecular bridges. Cys156 — an amino-acid involved in GDP-fuc-binding — could be changed to Ser without loss of activity.

fucosyltransferase V produced in eukaryotic cells was glycosylated and exhibits a high measure of heterogenicity. Deglycosylation with N-glycosidase F led to a lower molecular weight and the signal appearing in SDS-PAGE was focused to a distinct band. Analyses with specific lectins showed a dominating level of high-mannose N-glycans on fucosyltransferase V expressed in insect cells.

Hepta-peptide libraries were selected against recombinant fucosyltransferase V to develop specific inhibitors using the phage display technology. The use of a library of circular peptides led to specific ligands of the fucosyltransferase which showed no significant inhibitoric effect.

Literatur

- [1] Ahmed, A. K., Schaffer, S. W. und Wetlaufer, D. B. (1975). Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J Biol Chem*, 250(21):8477–82.
- [2] Baenziger, J. U., Kumar, S., Brodbeck, R. M., Smith, P. L. und Beranek, M. C. (1992). Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1):334–8.
- [3] Bastida, A., Latorre, M. und Garcia-Junceda, E. (2003). In vivo chaperone-assisted folding of alpha-1,6-fucosyltransferase from *Rhizobium* sp. *ChemBiochem*, 4(6):531–3.
- [4] Bella, A. und Kim, Y. S. (1971). Inhibition of rat small-intestinal alpha-(1 leads to 2)-fucosyltransferase. *Biochem J*, 125(4):1157–8.
- [5] Birnboim, H. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–23.
- [6] Breton, C., Oriol, R. und Imberty, A. (1998). Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases. *Glycobiology*, 8(1):87–94.
- [7] Cai, S., Struot, M., Hakomori, S. und Toyokuni, T. (1992). Synthesis of carbocyclic analogues of guanosine 5'-(beta-l-fucopyranosyl diphosphate) (GDP-fucose) as potential inhibitors of fucosyltransferases. *J. Org. Chem.*, 57:6693–96.
- [8] Cailleau-Thomas, A., Coullin, P., Candelier, J. J., Balanzino, L. und Mennesson, B. *et al.* (2000). FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis. *Glycobiology*, 10(8):789–802.
- [9] Cameron, H. S., Szczepaniak, D. und Weston, B. W. (1995). Expression of human chromosome 19p alpha(1,3)-fucosyltransferase genes in normal tissues. Alternative splicing, polyadenylation, and isoforms. *J Biol Chem*, 270(34):20112–22.
- [10] Chaudhary, J., Walia, M., Matharu, J., Escher, E. und Grover, A. K. (2001). Caloxin: a novel plasma membrane Ca²⁺ pump inhibitor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(4):C1027–30.

- [11] Christensen, L. L., Bross, P. und Orntoft, T. F. (2000a). Glycosylation of the N-terminal potential N-glycosylation sites in the human alpha1,3-fucosyltransferase V and -VI (hFucTV and -VI). *Glycoconj J*, 17(12):859–65.
- [12] Christensen, L. L., Jensen, U. B., Bross, P. und Orntoft, T. F. (2000b). The C-terminal N-glycosylation sites of the human alpha1,3/4-fucosyltransferase III, -V, and -VI (hFucTIII, -V, and -VI) are necessary for the expression of full enzyme activity. *Glycobiology*, 9(10):931–9.
- [13] Chu, F. K., Takase, K., Guarino, D. und Maley, F. (1985). Diverse properties of external and internal forms of yeast invertase derived from the same gene. *Biochemistry*, 24(22):6125–32.
- [14] Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2172–5.
- [15] Costa, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M. und Conradt, H. S. (1997a). Stable expression of the Golgi form and secretory variants of human fucosyltransferase III from BHK-21 cells. Purification and characterization of an engineered truncated form from the culture medium. *J Biol Chem*, 272(17):11613–21.
- [16] Costache, M., Apoil, P. A., Cailleau, A., Elmgren, A. und Larson, G. *et al.* (1997a). Evolution of fucosyltransferase genes in vertebrates. *J Biol Chem*, 272(47):29721–8.
- [17] Costache, M., Cailleau, A., Fernandez-Mateos, P., Oriol, R. und Mollicone, R. (1997b). Advances in molecular genetics of alpha-2- and alpha-3/4-fucosyltransferases. *Transfus Clin Biol*, 4(4):367–82.
- [18] de Vries, T., Knegt, R. M., Holmes, E. H. und Macher, B. A. (2001). Fucosyltransferases: structure/function studies. *Glycobiology*, 11(10):119–128.
- [19] de Vries, T., Srnka, C. A., Palcic, M. M., Swiedler, S. J. und van den Eijnden, D. H. *et al.* (1995). Acceptor specificity of different length constructs of human recombinant alpha 1,3/4-fucosyltransferases. Replacement of the stem region and the transmembrane domain of fucosyltransferase V by protein A results in an enzyme with GDP-fucose hydrolyzing activity. *J Biol Chem*, 270(15):8712–22.
- [20] de Vries, T., Yen, T. Y., Joshi, R. K., Storm, J. und van Den Eijnden, D. H. *et al.* (2001). Neighboring cysteine residues in human fucosyltransferase VII are engaged in disulfide bridges, forming small loop structures. *Glycobiology*, 11(5):423–32.

- [21] DiFalco, M. R., Bakopanos, E., Patricelli, M., Chan, G. und Congote, L. F. (1997). The influence of various insect cell lines, p10 and polyhedrin promoters in the production of secreted insulin-like growth factor-interleukin-3 chimeras in the baculovirus expression system. *J Biotechnol*, 56(1):49–56.
- [22] Dimitroff, C. J., Kupper, T. S. und Sackstein, R. (2003). Prevention of leukocyte migration to inflamed skin with a novel fluorosugar modifier of cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Clin Invest*, 112(7):1008–18.
- [23] Dupuy, F., Petit, J. M., Mollicone, R., Oriol, R. und Julien, R. *et al.* (1999). A single amino acid in the hypervariable stem domain of vertebrate alpha1,3/1,4-fucosyltransferases determines the type 1/type 2 transfer. Characterization of acceptor substrate specificity of the lewis enzyme by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 274(18):12257–62.
- [24] El-Battari, A., Prorok, M., Angata, K., Mathieu, S. und Zerfaoui, M. *et al.* (2003). Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology*, 13(12):941–53.
- [25] Fukuda, M., Bierhuizen, M. F. und Nakayama, J. (1996). Expression cloning of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 6(7):683–9.
- [26] Gallet, P. F., Vaujour, H., Petit, J. M., Maftah, A. und Oulmouden, A. *et al.* (1998). Heterologous expression of an engineered truncated form of human Lewis fucosyltransferase (Fuc-TIII) by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, 8(9):919–25.
- [27] Gersten, K. M., Natsuka, S., Trinchera, M., Petryniak, B. und Kelly, R. J. *et al.* (1995). Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human ELAM-1 ligand fucosyltransferase. *J Biol Chem*, 270(42):25047–56.
- [28] Giannis, A. und Kolter, T. (1993). Peptidmimetika für Rezeptorliganden-Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven. *Angew. Chem.*, 267:437–47.
- [29] Goelz, S. E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B. und Tizard, R. *et al.* (1990). ELFT: a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand. *Cell*, 63(6):1349–56.
- [30] Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A. und Lorimer, G. H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature*, 342(6252):884–9.

- [31] Golovacheva, R. S., Loginova, L. G., Salikhov, T. A., Kolesnikov, A. A. und Zaitseva, G. N. (1975). [New species of thermophilic bacilli — *Bacillus thermocatenulatus* nov. sp.]. *Mikrobiologiya*, 44(2):265–8.
- [32] Gong, X., Zhong, W. und Wu, W. (2004). Cloning and GST-fused expression in *E. coli* of mouse beta-1,4-galactosyltransferase. *J Zhejiang Univ Sci*, 35:164–72.
- [33] Grabenhorst, E. und Conradt, H. S. (1999). The cytoplasmic, transmembrane, and stem regions of glycosyltransferases specify their in vivo functional sublocalization and stability in the Golgi. *J Biol Chem*, 273(51):36107–16.
- [34] Grabenhorst, E., Nimtz, M., Costa, J. und Conradt, H. S. (1998). In vivo specificity of human alpha1,3/4-fucosyltransferases III–VII in the biosynthesis of LewisX and Sialyl LewisX motifs on complex-type N-glycans. Coexpression studies from bhk-21 cells together with human beta-trace protein. *J Biol Chem*, 273(47):30985–94.
- [35] Hada, T., Fukui, K., Ohno, M., Akamatsu, S. und Yazawa, S. *et al.* (1995). Increased plasma alpha (1/3)-L-fucosyltransferase activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Glycoconj J*, 12(5):627–31.
- [36] Harrap, K. A. (1972). The structure of nuclear polyhedrosis viruses. 3. Virus assembly. *Virology*, 50(1):133–9.
- [37] Hillcoat, B. L., Nixon, P. F. und Blakley, R. L. (1967). Effect of substrate decomposition on the spectrophotometric assay of dihydrofolate reductase. *Anal Biochem*, 21(2):178–89.
- [38] Holmes, E. H., Ostrander, G. K. und Hakomori, S. (1985). Enzymatic basis for the accumulation of glycolipids with X and dimeric X determinants in human lung cancer cells (NCI-H69). *J Biol Chem*, 260(12):7619–27.
- [39] Holmes, E. H., Xu, Z., Sherwood, A. L. und Macher, B. A. (1995). Structure-function analysis of human alpha 1→3fucosyltransferase. A GDP-fucose-protected, N-ethylmaleimide-sensitive site in FucT-III and FucT-V corresponds to Ser178 in FucT-IV. *J Biol Chem*, 270(14):8145–51.
- [40] Holmes, E. H., Yen, T. Y., Thomas, S., Joshi, R. und Nguyen, A. *et al.* (2000). Human alpha 1,3/4 fucosyltransferases. Characterization of highly conserved cysteine residues and N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem*, 275(32):24237–45.
- [41] Howard, D. R., Fukuda, M., Fukuda, M. N. und Stanley, P. (1987). The GDP-fucose:N-acetylglucosaminide 3-alpha-L-fucosyltransferase of LEC11 and LEC12 Chinese hamster ovary mutants exhibit novel specificities for glycolipid substrates. *J Biol Chem*, 262(35):16830–7.

- [42] Hsu, T. A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K. und Shimada, I. *et al.* (1997). Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J Biol Chem*, 272(14):9062–70.
- [43] Huang, W., Beharry, Z., Zhang, Z. und Palzkill, T. (2003). A broad-spectrum peptide inhibitor of beta-lactamase identified using phage display and peptide arrays. *Protein Eng*, 16(11):853–60.
- [44] Inaba, Y., Ohyama, C., Kato, T., Satoh, M. und Saito, H. *et al.* (2003). Gene transfer of alpha1,3-fucosyltransferase increases tumor growth of the PC-3 human prostate cancer cell line through enhanced adhesion to prostatic stromal cells. *Int J Cancer*, 107(6):949–57.
- [45] Jarvis, D., Kwar, Z. und Hollister, J. (1998). Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr Opin Biotechnol*, 9(52):528–33.
- [46] Javaud, C., Dupuy, F., Maftah, A., Julien, R. und Petit, J. M. (2003). The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. *Genetica*, 118(2-3):157–70.
- [47] Jayalakshmi, V., Biet, T., Peters, T. und Krishna, N. (2004). Refinement of the conformation of UDP-galactose bound to galactosyltransferase using the STD NMR intensity-restrained CORCEMA optimization. *J Am Chem Soc*, 126:8610–1.
- [48] Johnson, P. H., Donald, A. S. und Watkins, W. M. (1993). Purification and properties of the alpha-3/4-L-fucosyltransferase released into the culture medium during the growth of the human a431 epidermoid carcinoma cell line. *Glycoconj J*, 10(2):152–64.
- [49] Jorgensen, T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K. J. und Danielsen, H. E. *et al.* (1995). Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*, 55(9):1817–9.
- [50] Kakuda, S., Oka, S. und Kawasaki, T. (2004). Purification and characterization of two recombinant human glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 35:111–9.
- [51] Kaminaga, Y., Sahin, F. und Mizukami, H. (2004). Molecular cloning and characterization of a glucosyltransferase catalyzing glucosylation of curcumin in cultured *catharanthus roseus* cells. *FEBS Lett*, 567:197–202.

- [52] Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y. und Nishihara, S. *et al.* (1999a). Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett*, 452(3):237–42.
- [53] Kannagi, R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J*, 14(5):577–84.
- [54] Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. und Kimura, N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*, 95(5):377–84.
- [55] Khatib, A. M., Kontogiannea, M., Fallavollita, L., Jamison, B. und Meterissian, S. *et al.* (1999). Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res*, 59(6):1356–61.
- [56] Kleene, R. und Berger, E. G. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta*, 1154(3-4):283–325.
- [57] Klopocki, A. G., Laskowska, A., Antoniewicz-Papis, J., Duk, M. und Lisowska, E. *et al.* (1998). Role of sialosyl Lewis(a) in adhesion colon cancer cells — the antisense RNA approach. *Eur J Biochem*, 253(1):309–18.
- [58] Knibbs, R. N., Craig, R. A., Natsuka, S., Chang, A. und Cameron, M. *et al.* (1996). The fucosyltransferase FucT-VII regulates E-selectin ligand synthesis in human T cells. *J Cell Biol*, 133(4):911–20.
- [59] Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A. und Medina, O. P. *et al.* (1999). Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol*, 17(8):768–74.
- [60] Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1976). Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annu Rev Biochem*, 45:217–37.
- [61] Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Kaneko, M. und Hiraga, T. *et al.* (1998). Expression cloning and characterization of a novel murine alpha1, 3-fucosyltransferase, mFuc-TIX, that synthesizes the Lewis x (CD15) epitope in brain and kidney. *J Biol Chem*, 273(41):26729–38.
- [62] Kukowska-Latallo, J. F., Larsen, R. D., Nair, R. P. und Lowe, J. B. (1990). A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Genes Dev*, 4(8):1288–303.
- [63] Kulakosky, P. C., Hughes, P. R. und Wood, H. A. (1998a). N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology*, 8(7):741–5.

- [64] Kulakosky, P. C., Shuler, M. L. und Wood, H. A. (1998b). N-glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in three insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 34(2):101–8.
- [65] Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Izawa, M., Kimura, N. und Otsubo, N. *et al.* (1998). Specific detection of sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α core structure as a tumor-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(2):514–7.
- [66] Kumar, R., Potvin, B., Muller, W. A. und Stanley, P. (1991). Cloning of a human α (1,3)-fucosyltransferase gene that encodes ELFT but does not confer ELAM-1 recognition on Chinese hamster ovary cell transfectants. *J Biol Chem*, 266(32):21777–83.
- [67] Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.
- [68] Lammers, G. und Jamieson, J. C. (1990). Cathepsin D-like activity in the release of Gal beta 1-4GlcNAc alpha 2-6sialyltransferase from mouse and guinea pig liver Golgi membranes during the acute phase response. *Comp Biochem Physiol B*, 95(2):327–34.
- [69] Lee, L. V., Mitchell, M. L., Huang, S. J., Fokin, V. V. und Sharpless, K. B. *et al.* (2003). A potent and highly selective inhibitor of human alpha-1,3-fucosyltransferase via click chemistry. *J Am Chem Soc*, 125(32):9588–9.
- [70] Lee, Y. C. (1992). Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. *FASEB J*, 6(13):3193–200.
- [71] Lesinski, G. B., Smithson, S. L., Srivastava, N., Chen, D. und Widera, G. *et al.* (2001). A DNA vaccine encoding a peptide mimic of Streptococcus pneumoniae serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine*, 19(13–14):1717–26.
- [72] Lowe, J. B. (2003). Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol*, 15(5):531–8.
- [73] Lowe, J. B., Kukowska-Latallo, J. F., Nair, R. P., Larsen, R. D. und Marks, R. M. *et al.* (1991b). Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1-dependent cell adhesion. *J Biol Chem*, 266(26):17467–77.
- [74] Ma, J. und Colley, K. J. (1996). A disulfide-bonded dimer of the Golgi beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose. *J Biol Chem*, 271(13):7758–66.

- [75] Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea 3rd, A. G., Slatko, B. E. und Moran, L. S. *et al.* (1988). An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene*, 74(2):365–73.
- [76] Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C. E. und Smith, P. L. *et al.* (1996). The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell*, 86(4):643–53.
- [77] Marshall, R. D. (1974). The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem Soc Symp*, 16(40):17–26.
- [78] Marston, F. A. O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. *Biochem J*, 240:1–12.
- [79] Martin, S. L., Edbrooke, M. R., Hodgman, T. C., van den Eijnden, D. H. und Bird, M. I. (1997). Lewis X biosynthesis in Helicobacter pylori. Molecular cloning of an alpha(1,3)-fucosyltransferase gene. *J Biol Chem*, 272(34):21349–56.
- [80] Martin-Satue, M., Marrugat, R., Cancelas, J. A. und Blanco, J. (1998). Enhanced expression of $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes correlates with E-selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 58(7):1544–50.
- [81] Marz, L. und Hatton, M. W. (1984). A proposal: that the heterogeneity of glycoprotein N-glycans is a feature of their biosynthesis and may be of functional significance. *Int J Biochem*, 16(3):253–6.
- [82] Meiring, M. S., Litthauer, D., Harsfalvi, J., van Wyk, V. und Badenhorst, P. N. *et al.* (2002). In vitro effect of a thrombin inhibition peptide selected by phage display technology. *Thromb Res*, 107(6):365–71.
- [83] Meyer, B. und Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie*, 42(8):864–890.
- [84] Mollicone, R., Gibaud, A., Francois, A., Ratcliffe, M. und Oriol, R. (1990). Acceptor specificity and tissue distribution of three human alpha-3-fucosyltransferases. *Eur J Biochem*, 191(1):169–76.
- [85] Morais, V. und Costa, J. (2003). Stable expression of recombinant human $\alpha 3/4$ -fucosyltransferase III in Spodoptera frugiperda Sf9 cells. *J Biotechnol*, 106:69–75.
- [86] Morais, V. A., Costa, M. T. und Costa, J. (2003). N-glycosylation of recombinant human fucosyltransferase III is required for its in vivo folding in mammalian and insect cells. *Biochim Biophys Acta*, 1619(2):133–8.

- [87] Morais, V. A., Serpa, J., Palma, A. S., Costa, T. und Maranga, L. *et al.* (2001). Expression and characterization of recombinant human α -3/4-fucosyltransferase III from *Spodoptera frugiperda* (SF9) and *Trichoplusia ni* (Tn) cells using the baculovirus expression system. *Biochem J*, 353(Pt 3):719–25.
- [88] Muniz, J. R., Alves, C. A., de Pieri, C., Beltramini, L. M. und Selistrede Araujo, H. S. *et al.* (2004). Overexpression, purification, biochemical characterization, and molecular modeling of recombinant GDP-mannosyltransferase (GumH) from *Xylella fastidiosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(15):485–92.
- [89] Murali, R. und Kieber-Emmons, T. (1997). Molecular recognition of a peptide mimic of the Lewis Y antigen by an anti-Lewis Y antibody. *J Mol Recognit*, 10(6):269–76.
- [90] Murray, B. W., Takayama, S., Schultz, J. und Wong, C. H. (1996). Mechanism and specificity of human alpha-1,3-fucosyltransferase V. *Biochemistry*, 35(34):11183–95.
- [91] Murray, B. W., Wittmann, V., Burkart, M. D., Hung, S. C. und Wong, C. H. (1997). Mechanism of human alpha-1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack. *Biochemistry*, 36:823–31.
- [92] Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H. und Ishikawa, O. *et al.* (1997). Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis Colon Rectum*, 40(4):420–31.
- [93] Narita, T., Kawakami-Kimura, N., Kasai, Y., Hosono, J. und Nakashio, T. *et al.* (1996). Induction of E-selectin expression on vascular endothelium by digestive system cancer cells. *J Gastroenterol*, 31(2):299–301.
- [94] Natsuka, S., Gersten, K. M., Zenita, K., Kannagi, R. und Lowe, J. B. (1994). Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha-1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant. *J Biol Chem*, 269(24):16789–94.
- [95] Nguyen, A. T., Holmes, E. H., Whitaker, J. M., Ho, S. und Shetterly, S. *et al.* (1998). Human alpha1,3/4-fucosyltransferase. I. Identification of amino acids involved in acceptor substrate binding by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 273(39):25244–9.
- [96] Niemela, R., Natunen, J., Majuri, M. L., Maaheimo, H. und Helin, J. *et al.* (1998). Complementary acceptor and site specificities of Fuc-TIV and Fuc-TVII allow effective biosynthesis of sialyl-TriLex and related polylectosamines present on glycoprotein counterreceptors of selectins. *J Biol Chem*, 273(7):4021–6.

- [97] Nishihara, S., Iwasaki, H., Kaneko, M., Tawada, A. und Ito, M. *et al.* (1999). Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9; Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polylactosamine chain while the other four alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue. *FEBS Lett*, 462(3):289–94.
- [98] Norris, A. J., Whitelegge, J. P., Strouse, M. J., Faull, K. F. und Toyokuni, T. (2004). Inhibition kinetics of carba- and C-fucosyl analogues of GDP-fucose against fucosyltransferase V: implication for the reaction mechanism. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(3):571–3.
- [99] O'Reilly, D., Miller, L. und Luckow, V. (1994). *Baculovirus expression vektors. A laboratory manual*. Oxford University Press.
- [100] Pajot-Augy, E., Bozon, V., Remy, J. J., Couture, L. und Salesse, R. (1999). Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem*, 260(3):635–48.
- [101] Paulson, J. C. und Colley, K. J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 264(30):17615–8.
- [102] Qian, R., Chen, C. und Colley, K. J. (2001). Location and mechanism of alpha 2,6-sialyltransferase dimer formation. Role of cysteine residues in enzyme dimerization, localization, activity, and processing. *J Biol Chem*, 276(31):28641–9.
- [103] Qiao, L., Murray, B. W., Shimazaki, S. J., Schultz, J. und Wong, C. H. (1996). Synergistic inhibition of human alpha1,3-fucosyltransferase V. *J. Am. Chem. Society*, 118:7653–62.
- [104] Roelvink, P. W., van Meer, M. M., de Kort, C. A., Possee, R. D. und Hammock, B. D. *et al.* (1992). Dissimilar expression of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 genes. *J Gen Virol*, 73 (Pt 6):1481–9.
- [105] Rudolph, R. und Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J*, 10(1):49–56.
- [106] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J. und Higuchi, R. *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–91.
- [107] Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M. und Watanabe, E. *et al.* (1994). Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *J Biol Chem*, 269(20):14730–7.

- [108] Schachter, H. (1991). The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. *Glycobiology*, 1(5):453–61.
- [109] Schein, C. und Noteborn, M. (1989). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology*, Seiten 291–294.
- [110] Schrag, J. D., Procopio, D. O., Cygler, M., Thomas, D. Y. und Bergeron, J. J. (2003). Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci*, 28(1):49–57.
- [111] Schuster, M. und Blechert, S. (2001). Inhibition of fucosyltransferase V by a GDP-Azasugar. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(14):1809–11.
- [112] Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M. und Peeters, B. *et al.* (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem*, 262(4):1596–601.
- [113] Shibuya, N., Goldstein, I. J., Van Damme, E. J. und Peumans, W. J. (1988). Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem*, 263(2):728–34.
- [114] Shinkai, A., Shinoda, K., Sasaki, K., Morishita, Y. und Nishi, T. *et al.* (1997). High-level expression and purification of a recombinant human alpha-1, 3-fucosyltransferase in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, 10(3):379–85.
- [115] Sibille, P., Ternynck, T., Nato, F., Buttin, G. und Strosberg, D. *et al.* (1997). Mimotopes of polyreactive anti-DNA antibodies identified using phage-display peptide libraries. *Eur J Immunol*, 27(5):1221–8.
- [116] Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228:1315–7.
- [117] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K. und Gartner, F. H. *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85.
- [118] Smith, P. L. und Baenziger, J. U. (1992). Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1):329–33.
- [119] Spiro, R. G. (1973). Glycoproteins. *Adv Protein Chem*, 27:349–467.
- [120] Stangier, K., Palcic, M. M., Bundle, D. R., Hindsgaul, O. und Thiem, J. (1997). Fucosyltransferase-catalyzed formation of L-galactosylated Lewis structures. *Carbohydr Res*, 305(3-4):511–5.
- [121] Stockwin, L. H. und Holmes, S. (2003). Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance. *Expert Opin Biol Ther*, 3(7):1133–52.

- [122] Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y. und Williams, D. B. (2001). Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem*, 276(43):39779–87.
- [123] Thiem, S. M. und Miller, L. K. (1990). Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene*, 91(1):87–94.
- [124] Tretter, V., Altmann, F. und Marz, L. (1991). Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem*, 199(3):647–52.
- [125] van Die, I., van Tetering, A., Bakker, H., van den Eijnden, D. H. und Joziase, D. H. (1996). Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a beta 1→4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, 6(2):157–64.
- [126] Vandenbroucke, A., Dolmans, M., de Vries-Petiau, G. M. und Leonis, J. (1976). Purification of human milk fucosyltransferase [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim*, 84(5):1111–2.
- [127] Vo, L., Lee, S., Marcinko, M. C., Holmes, E. H. und Macher, B. A. (1998). Human alpha1,3/4-fucosyltransferases. II. A single amino acid at the COOH terminus of FucT III and V alters their kinetic properties. *J Biol Chem*, 273(39):25250–5.
- [128] Voss, T., Ergulen, E., Ahorn, H., Kubelka, V. und Sugiyama, K. *et al.* (1993). Expression of human interferon omega 1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type N-linked glycosylation or sialylation. *Eur J Biochem*, 217(3):913–9.
- [129] Walravens, K., Matheise, J. P., Knott, I., Coppe, P. und Collard, A. *et al.* (1996). Immunological response of mice to the bovine respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in recombinant baculovirus infected insect cells. *Arch Virol*, 141(12):2313–26.
- [130] Wang, W. und Malcolm, B. A. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*, 26(4):680–2.
- [131] Wang, W. C. und Cummings, R. D. (1988). The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem*, 263(10):4576–85.

- [132] Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H. und Paulson, J. C. (1987). Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *J Biol Chem*, 262(36):17735–43.
- [133] Weston, B. W., Hiller, K. M., Mayben, J. P., Manousos, G. A. und Bendt, K. M. *et al.* (1999). Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 59(9):2127–35.
- [134] Weston, B. W., Nair, R. P., Larsen, R. D. und Lowe, J. B. (1992a). Isolation of a novel human alpha (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J Biol Chem*, 267(6):52–60.
- [135] Weston, B. W., Smith, P. L., Kelly, R. J. und Lowe, J. B. (1992b). Molecular cloning of a fourth member of a human alpha (1,3)fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x, and difucosyl sialyl Lewis x epitopes. *J Biol Chem*, 267(34):24575–84.
- [136] Wong, C., Dumas, D., Ichikawa, Y., Koseki, K. und Danishefski, S. *et al.* (1992). Specificity, inhibition and synthetic utility of a recombinant human alpha-1,3-fucosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:7321–22.
- [137] Wu, H. C., Yeh, C. T., Huang, Y. L., Tarn, L. J. und Lung, C. C. (2001). Characterization of neutralizing antibodies and identification of neutralizing epitope mimics on the Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Appl Environ Microbiol*, 67(7):3201–7.
- [138] Xu, Z., Vo, L. und Macher, B. A. (1996). Structure-function analysis of human alpha1,3-fucosyltransferase. Amino acids involved in acceptor substrate specificity. *J Biol Chem*, 271(15):8818–23.
- [139] Yamada, N., Chung, Y. S., Takatsuka, S., Arimoto, Y. und Sawada, T. *et al.* (1997). Increased sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with acquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line. *Br J Cancer*, 76(5):582–7.
- [140] Yamamoto, F., Marken, J., Tsuji, T., White, T. und Clausen, H. *et al.* (1990). Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem*, 265(2):1146–51.
- [141] Zollner, T. M. und Asadullah, K. (2003). Selectin and selectin ligand binding: a bittersweet attraction. *J Clin Invest*, 112(7):980–3.

Anhang

Entsorgung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt und nach der Verordnung über gefährliche Stoffe (Gefahrgutverordnung) entsorgt. Organische halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel wurden getrennt in gekennzeichnete Behälter überführt. Kontaminierte Betriebsmittel wurden in dafür vorgesehenen Behältern gesammelt. Ethidiumbromid-Abfälle wurden in gesondert gekennzeichnete Behälter entsorgt. ^{14}C -markierte Abfälle wurden in die dafür vorgesehenen Abfallbehälter für ^{14}C -kontaminierte Feststoffe und Flüssigkeiten gegeben. Die Arbeit mit humanen Zellen war auf Zellkultur-Laboratorien beschränkt. S1-kontaminierter Abfall wurde vor der Entsorgung in einem Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 Minuten bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ hitzesterilisiert.

Gefahrstoffe/Sicherheitsdaten

Die Reagenzien und Lösungsmittel in Tabelle B.1 waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheits-Ratschlägen nach §6 der Gefahrstoffverordnung versehen.

Verbindung	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
ABTS	Xi	36/37/38	26-36
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45 -
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
BCIP	-	-	22-24/25
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	-	-	24/25 -
Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Dithiothreitol	Xi	36/37/38	36/37/39-22
EDTA	Xn	22	-
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Gentamicin Sulfat	Xn	42/43	22-45-36/37/39
Glutardialdehyd, 25 %	T, N	22-23-34-42/43-50	26-36/37/39-45-61
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Kanamycin Sulfat	T	61	26-36/37-39-45
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45 -
NaOH	C	35	26-37/39-45
NBT	Xn	20/21-33	22-45
Phenol (Tris-gesättigt)	T	24/25-34	28.6-45
Salzsäure, konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	Xn	22-36/38	22-24/25
TEMED	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Tris	Xi	36/38	-
Wasserstoffperoxid 30 %	C	34	3-28-36/39-45

Tabelle B.1 R- und S-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht denkbar gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine Fürsprache und Unterstützung. Herrn Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller danke ich besonders für die praktische und theoretische Anleitung, für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie für die vielen fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen. Herrn Dr. Ezard Spillner danke ich für die fachlichen Ratschläge und die vielen fruchtbaren Anregungen, die er dieser Arbeit beigesteuert hat.

Allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern des Arbeitskreises sowie der gesamten Abteilung danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich meine Laborkollegen Marcel Krepstakies, Hilke Heimhold, Daniela Holland, Tina Even und Christina Ehlers sowie meinen Praktikanten Tobias Schenk und Nastaran Behzadnia danken. Danken möchte ich auch Mark Matzas für die nette Zeit und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für die dauerhafte Unterstützung sowie meinem Bruder Peter für die unermüdliche Hilfe bei Computer- und Layoutproblemen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Birte Sommer, die mir jetzt schon seit vier Jahren so gut sie kann den Rücken freihält und mir immer wieder deutlich macht, daß das Leben vielseitiger ist, als es mir häufig erscheint.

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt sowie keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Jan Münster

