

Physiologische Charakterisierung und Expression von humanen Tyrosylprotein Sulfotransferasen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereiches Chemie

der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von Dipl.-Biochem. Sandra Götsch

Dortmund, März 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis März 2003 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von PD Dr. Peter Bayer in der MPI-Nachwuchsgruppe Molekulare und Strukturelle Biophysik durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann
2. Gutachter: PD Dr. P. Bayer

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Sandra Göttisch

Dortmund, den

Inhalt

INHALT	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Sulfatmetabolismus von Säugetieren	1
1.2 Sulfatierung von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen	3
1.2.1 Humane zytosolische Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Lipiden.....	3
1.2.2 Humane Kohlenhydrat Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Glykanen	3
1.2.3 Humane Tyrosylprotein Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Proteinen.....	5
1.3 Struktur und Reaktionsmechanismus von Sulfotransferasen	5
1.3.1 Struktur von humanen Sulfotransferasen	5
1.3.2 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Sulfotransferasen	9
1.4 Physiologische Bedeutung der Sulfatierung von Tyrosyl-Resten	10
1.5 Humane Tyrosylprotein Sulfotransferasen (TPST)	12
1.6 Schubspannung als Regulator von Genexpression	16
1.7 Zielstellung der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Molekularbiologische Produkte.....	18
2.1.3 Nährmedien	21
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.2.1.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	23
2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA.....	24
2.2.1.5 DNA-Sequenzierung	24
2.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.1.7 Einführung von Mutationen in doppelsträngige DNA	25
2.2.1.8 Herstellung von His-Hirudin und Ligation in pET-28a	25
2.2.2 Proteinchemische Methoden.....	26
2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.2.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE).....	26
2.2.2.3 Trichloressigsäurefällung.....	26
2.2.2.4 Western-Blot	27
2.2.2.5 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC).....	27
2.2.2.6 Dialyse.....	28
2.2.2.7 Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese.....	28

2.2.2.8 In-Gel Verdau und Identifizierung proteolytischer Peptide.....	29
2.2.2.9 TPST-Enzymaktivitätsassay.....	30
2.2.3 Bakterien- und Zellkultur	30
2.2.3.1 <i>E. coli</i> -Stämme in Kultur	30
2.2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	31
2.2.3.3 Herstellung von <i>E. coli</i> -Glyzerinkulturen	31
2.2.3.4 <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21) -Zellen in Kultur	31
2.2.3.5 Herstellung von Sf21-Glyzerinkulturen	31
2.2.3.6 <i>Pichia pastoris</i> X-33-Zellen in Kultur	32
2.2.3.7 Herstellung kompetenter <i>P. pastoris</i> X-33-Zellen	32
2.2.3.8 Herstellung von <i>P. pastoris</i> X-33-Glyzerinkulturen	32
2.2.3.9 Bestimmung des Mut-Phänotypes von <i>P. pastoris</i> X-33-Zellen	32
2.2.3.10 Isolierung und Kultivierung venöser Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC).....	32
2.2.3.11 COS-7-Zellen in Kultur.....	33
2.2.4 Arbeiten mit <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.2.4.1 Transformation eines Plasmid-Vektors in <i>E. coli</i> -Wirtszellen.....	33
2.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Wirtszellen	34
2.2.4.3 <i>E. coli</i> -Expressionskulturen	34
2.2.4.4 Bakterien-Aufschluss	34
2.2.4.5 Reinigung von Einschlusskörpern (Inclusion Bodies).....	34
2.2.4.6 Denaturierung und Rückfaltung von Proteinen aus Inclusion Bodies	35
2.2.5 Arbeiten mit Sf21-Zellen.....	35
2.2.5.1 Transfektion von Sf21-Zellen	35
2.2.5.2 Isolierung rekombinanter Viren im „Plaque-Test“	36
2.2.5.3 Vermehrung rekombinanter Viren	36
2.2.5.4 Identifizierung rekombinanter Baculoviren mittels PCR.....	37
2.2.5.5 Herstellen einer Virusstammlösung mit hohem Titer	37
2.2.5.6 Titerbestimmung von Viruslösungen mittels Endpunktverdünnung	38
2.2.5.7 Expression von <i>hTPST1ΔTMD</i> in Sf21-Zellen	38
2.2.6 Arbeiten mit <i>P. pastoris</i> X-33-Zellen.....	38
2.2.6.1 Transformation eines Plasmid-Vektors in <i>P. pastoris</i> X-33	38
2.2.6.2 Analyse der X-33-Transformanten.....	39
2.2.6.3 Expression von <i>hTPSTΔTMD</i> in X-33 nach Mut ⁺ -Phänotyp	39
2.2.6.4 Expression von <i>hTPSTΔTMD</i> in X-33 nach Mut ^s -Phänotyp	40
2.2.6.5 Aufschluss von <i>P. pastoris</i> X-33-Zellen	40
2.2.7 Arbeiten mit HUVEC	40
2.2.7.1 Applikation von laminarer Schubspannung	40
2.2.7.2 mRNA-Isolierung aus HUVEC und Reverse Transkription	42
2.2.7.3 Protein-Isolierung aus HUVEC.....	42
2.2.8 Arbeiten mit COS-7-Zellen	42
2.2.8.1 Transfektion von COS-7-Zellen zur Expression von <i>hTPST1-GFP</i>	42
2.2.8.2 Färbung von Zellkern und Golgi in COS-7-Zellen	43
3 ERGEBNISSE.....	44
3.1 Herstellung und Reinigung von rekombinantem His-Hirudin.....	44
3.2 Herstellung von <i>hTPST1ΔTMD</i> zur Antikörper-Gewinnung.....	46

3.3. Intrazelluläre Lokalisation von hTPST1 in COS-7-Zellen	49
3.4 Laminare Schubspannung induziert TPST-Isoform-Wechsel in HUVEC	51
3.4.1 Expression von hTPST1- und hTPST2-mRNA in HUVEC.....	52
3.4.2 Induktion des Isoform-Wechsels von hTPST1 zu hTPST2 durch Schubspannung ..	53
3.4.3 Expression von hTPST1 in HUVEC	54
3.4.4 Zeitabhängigkeit der hTPST-mRNA-Regulation.....	55
3.4.5 Einfluss von Inhibitoren auf den hTPST-Isoform-Wechsel	56
3.4.6 Identifizierung hTPST-spezifischer Substrate in HUVEC-Überständen	57
3.5 Expression von aktivem Thioredoxin-hTPST1ΔTMD in vitro	59
3.6 Expression von hTPSTs in E.coli und Löslichkeitsstudien	61
3.6.1 Expression von humanen Tyrosylprotein Sulfotransferasen in E. coli	61
3.6.2 Einfluß verschiedener Pufferwechsel auf hTPST in Lösung.....	63
3.6.3 Rückfaltung von denaturiertem hTPST1ΔTMD und Thx-hTPST1ΔTMD	69
3.7 Expression von hTPST1ΔTMD in Sf21-Zellen	72
3.8 Expression von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD in P. pastoris X-33-Zellen ..	76
3.8.1 Klonierung von X-33 hTPST1ΔTMD und X-33 hTPST2ΔTMD-Konstrukten	76
3.8.2 Bestimmung des Mut-Phänotypes	79
3.8.3 Expression von hTPSTΔTMDs in X-33 und ihre Reinigung.....	81
3.8.3.1 Expression und Reinigung von hTPST1ΔTMD.....	81
3.8.3.2 Expression und Reinigung von hTPST2ΔTMD.....	86
3.8.3.2.1 Auswahl der Expressionsklone.....	86
3.8.3.2.2 Expression von hTPST2ΔTMD in X-33-Zellen.....	87
3.8.3.2.3 Reinigung von aktivem hTPST2ΔTMD	89
4.DISKUSSION	95
4.1 Intrazelluläre Lokalisation von hTPST1	95
4.2 Beeinflussung der Expression von hTPST-Isoformen in vivo	96
4.3 Expression von rekombinanten aktiven hTPSTs	99
4.3.1 Expression von Thx-hTPST1ΔTMD in vitro	99
4.3.2 Löslichkeit von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD in E. coli	100
4.3.3 Expression von hTPST1ΔTMD in Insekten-Zellen Sf21	102
4.3.4 Expression von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD in P. pastoris X-33	103
4.3.4.1 Vorteile des P. pastoris Expressionssystems	103
4.3.4.2 Expression von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD in Pichia pastoris X-33 ..	104
4.3.4.3 Ni-Chelat-Chromatografie von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD	106
4.3.4.4 Aktivität von hTPST1ΔTMD und hTPST2ΔTMD	107
5. AUSBLICK	110
6. ZUSAMMENFASSUNG	111
ERGÄNZENDE TABELLEN	113
LITERATUR	121

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Serum-Albumin des Rindes
CD	„Cluster of Differentiation“
CDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
D.	Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol, Cleland Reagenz racemisch
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
GSH	L-Glutathion, reduziert
GSSG	L-Glutathion, oxidiert
IB	Inclusion Bodies, Einschlußkörper
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalaktopyranosid
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF-Membran	Membran aus Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
TMD	Transmembrandomäne
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
X-Gal	5'-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Der Sulfatmetabolismus von Säugetieren

Schwefel gehört zu den essentiellen Bestandteilen organischen Lebens. Dabei wird der Schwefel in höheren Organismen in Form von anorganischem Sulfat metabolisiert. Anorganisches Sulfat (SO_4^{2-}) ist das viert-häufigste Anion im Plasma von Säugetieren. Es ist ein hoch dissoziiertes, hydrophiles und divalentes Ion, das für die normalen Zellfunktionen essentiell ist. Es ist demnach in allen Zelltypen zu finden.

Die Aufnahme von Sulfat-Ionen erfolgt über die Nahrung bzw. über das Trinkwasser (Smith und Jakoby, 1983) mit anschließender intestinaler Absorption des Anions (Krijgsheld *et al.*, 1979) durch ein elektroneutrales Natrium-Sulfat-Kotransport-System (Lucke *et al.*, 1981). Die Homöostase des anorganischen Sulfates wird durch die renale Reabsorption an der Bürstensaum-Membran der proximalen Tubulus-Zellen der Niere gewährleistet (Berglund, 1960). Der Sulfat-Ionen-Transport ist an den bestehenden Natrium-Gradienten an der luminalen Zellmembran in Form eines sekundär aktiven Transports mit dem Transport von zwei Natrium-Ionen gekoppelt. Sulfat unterliegt dabei einem sättigbaren Transport (Frick *et al.*, 1984). Der Transport von Sulfat kann an der luminalen Membran durch die Sulfat-Plasmakonzentration, Glukose, Aminosäuren und Phosphat gehemmt werden, da alle diese Substanzen an den Natrium-Transport gekoppelt in die Zelle gelangen.

An der basolateralen Zellseite verlässt Sulfat die Zelle wieder über einen Anionenaustauscher ins Blutplasma (Murer und Burckhardt, 1983; Ullrich *et al.*, 1985a; Ullrich *et al.*, 1985b; Ullrich *et al.*, 1985c; Ullrich *et al.*, 1985d).

Außer durch die Sulfat-Aufnahme und die Reabsorption der Anionen sind Methionin und Cystein aus der Nahrung und aus dem Abbau von Proteinen (Togawa *et al.*, 1990) und die durch Sulfatase-Aktivität freigesetzten Sulfat-Ionen, die bei der Degradation von Makromolekülen in Lysosomen entstehen (Curtis, 1982), weitere Quellen für anorganisches Sulfat im Blutplasma.

Die Regulation der Homöostase von Sulfat erfolgt in der Niere durch Absorption aus Prä-Urin, weniger durch Sekretion aus Blut (Berglund, 1960; Becker *et al.*, 1960). Dabei erlaubt der Anionenaustauscher auch den Transport von Sulfat in Sekretionsrichtung. Der Anteil des im Glomerulus filtrierte Sulfates, der ausgeschieden wird, ist der Differenz

von Plasmakonzentration und Nierenschwelle proportional (Sarre *et al.*, 1988). Normalerweise wird ca. ein Viertel des filtrierte Sulfates ausgeschieden.

Die Aufnahme von Sulfat-Ionen aus dem Blutplasma in die körpereigenen Zellen ist ein aktiver Transport (Castranova *et al.*, 1979). Innerhalb der Zellen werden die Sulfat-Ionen in einen energiereichen Donor, 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS), umgewandelt. Dieser Aktivierungsprozess wird durch zwei aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen katalysiert (Robbins und Lipmann, 1958) (Abb.1.1).

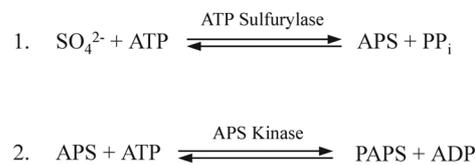


Abb.1.1 Schematische Darstellung der zellulären Bildung von PAPS. (SO_4^{2-} , Sulfat-Anion; ATP, 5'-Adenosintriphosphat; ADP, 5'-Adenosindiphosphat; PP_i , Pyrophosphat; APS, Adenosin 5'-phosphosulfat; PAPS, 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat)

Im ersten Schritt katalysiert die ATP-Sulfurylase die Bildung der adenylierten Form des Sulfat-Anions (APS) ausgehend von einem ATP-Molekül und SO_4^{2-} . Dieses Molekül wird in einem zweiten Schritt von der APS-Kinase zu PAPS phosphoryliert. In den Säugerzellen sind beide Enzymaktivitäten auf einer Polypeptidkette kodiert (Li *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1998; Kurima *et al.*, 1998; ul Haque *et al.*, 1998; Franzon *et al.*, 1999). Die Enzymfamilie wird als PAPS-Synthetasen bezeichnet.

In Form von PAPS kann das aktivierte Sulfat auf andere Moleküle durch Sulfotransferasen (E.C. 2.8.2.) übertragen werden (Falany, 1997b). Den PAPS-Synthetasen kommt dabei eine Schlüsselrolle in der Regulation der Sulfatierung zu, denn sämtliche Sulfotransferasen (mit Ausnahme einiger bakterieller Sulfat übertragender Enzyme) sind an PAPS als Sulfat-Donor gebunden (Klaassen und Boles, 1997). Bei dieser Sulfat-Übertragung wird das Akzeptor-Molekül sulfatiert.

Sulfatierung ist eine essentielle Modifikation von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, die viele biologische Prozesse kontrolliert (Superti-Furga, 1994). Im Weiteren soll näher auf wichtige biologische Einflüsse der Sulfatierung im Menschen und auf die humanen Sulfotransferasen eingegangen werden.

1.2 Sulfatierung von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen

1.2.1 Humane zytosolische Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Lipiden

Zytosolische Sulfotransferasen (SULT) katalysieren die Sulfatierung von kleinen lipophilen endogenen Molekülen und von Xenobiotika. Die Sulfatierung von anti-inflammatorischen Wirkstoffen, adrenergen Inhibitoren und Stimulatoren, von Xenobiotika und von Steroidhormonen führt zur Biotransformation dieser Moleküle (Roth, 1986; Hobkirk, 1993; Strott, 1996). In den meisten Fällen erhöht die Sulfatierung die Ausscheidung dieser Stoffe aufgrund besserer Löslichkeit (Falany, 1997a). Sie kann aber auch zur Aktivierung oder zur Inaktivierung von Molekülen, u.a. von Drogen, Karzinogenen, Steroiden, Thyroidhormonen und Neurotransmittern, führen (Mulder und Jakoby, 1990; Falany, 1991; Hobkirk, 1993; Weinshilboum und Otterness, 1994).

Im Menschen sind bisher zehn zytosolische Sulfotransferasen zumindest auf der genetischen Ebene identifiziert worden (Tab.5, Anhang). Die in der Tab.5 (Anhang) vorgenommene Einteilung der humanen zytosolischen Sulfotransferasen basiert auf Ähnlichkeiten ihrer Aminosäure-Sequenz (45% Identität zwischen SULT1 und SULT2) und ähnlichen katalytischen Eigenschaften (Transfer der Sulfonyl-Gruppe auf Phenole bzw. auf Alkohole) (Yamazoe *et al.*, 1994; Strott, 1996; Weinshilboum *et al.*, 1997). Die SULTs zeigen dabei distinkte, aber überlappende Substratspezifitäten. Der molekulare Mechanismus der SULT-Gen-Expression ist bisher wenig verstanden. Außer für SULT1E1 und SULT2A1 sind für alle humanen zytosolischen Sulfotransferasen mehrere cDNAs in den Datenbanken zu finden. Diese Unterschiede sind auf die 5'-untranslatierte Region beschränkt und könnten durch alternative Transkriptions-Initiation, alternatives Splicing oder durch beide Mechanismen hervorgerufen werden (Weinshilboum *et al.*, 1997). Die Genprodukte liegen in der Regel als Dimere vor (Homo- und Heterodimere), deren Monomere ein Molekulargewicht zwischen 30 und 36 kDa aufweisen (Falany, 1991; Weinshilboum *et al.*, 1994; Kiehlbauch *et al.*, 1995).

1.2.2 Humane Kohlenhydrat Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Glykanen

Kohlenhydrat Sulfotransferasen katalysieren im Golgi-Apparat die Sulfatierung von an Protein gebundenen Kohlenhydraten, die sich im Transit durch den sekretorischen Zellapparat befinden (Armstrong und Bertozzi, 2000).

Einige der Kohlenhydrat Sulfotransferasen sind am Aufbau großer, hochsulfatierter Glukosaminoglykane beteiligt, die sowohl strukturelle Komponenten der extrazellulären Matrix (Chondroitin Sulfat Sulfotransferasen, Heparan Sulfat Sulfotransferasen; Humphries *et al.*, 1986) sind, als auch Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Heparan Sulfat Sulfotransferasen), Chemokine (CHST1, CHST2, CHST3), Bakterien (CHSTs) und Viren (HS3STs) darstellen (Review in Habuchi, 2000). Dadurch sind Glukosaminoglykane (Chondroitin Sulfat, Dermatan Sulfat, Keratan Sulfat, Heparin und Heparan Sulfat) an der Regulation der zellulären Kommunikation, dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Blutkoagulation beteiligt (Salmivirta *et al.*, 1996; Rosenberg *et al.*, 1997).

Andere Kohlenhydrat Sulfotransferasen sind in der Biosynthese von sulfatierten O- oder N-gebundenen Oligosacchariden involviert, die als Liganden für Membran-gebundene und für sezernierte Rezeptoren fungieren (CST, GALNAC4S-6ST). Zu diesen Substraten gehören u.a. L-Selektin-Liganden und CD44 („cluster of differentiation“44), die an der Leukozyten-Adhäsion und ihrer Einwanderung an Entzündungsstellen (einschließlich der Abstoßung von Herztransplantaten), an der Angiogenese und der Tumor-Metastasierung beteiligt sind (Review in (Johnson *et al.*, 2000). Kohlenhydrat Sulfotransferasen werden daher als potentielle neuartige therapeutische Ansätze zur Bekämpfung von Entzündungen, viraler Infektionen und Krebs diskutiert (Hemmerich, 2001).

Insgesamt 35 humane Vertreter dieser im Golgi lokalisierten, membranständigen (ausgenommen HS3ST1; Shworak *et al.*, 1997) Enzyme wurden bisher in verschiedenen Geweben identifiziert (Tab.6, Anhang). Viele Kohlenhydrat Sulfotransferasen sind ubiquitär exprimiert (z.B. CHST1, CHST2; Fukuta *et al.*, 1997; Uchimura *et al.*, 1998), andere nur in spezifischen Geweben (z.B. CHST4 und CHST5 in „high endothelial venules“, C4ST in peripheren Leukozyten und Blut-bildendem Gewebe, CHST5 im Darmtrakt; Bistrup *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Hiraoka *et al.*, 1999).

Die Bezeichnung dieser Sulfotransferase-Familie beruht einerseits auf Ähnlichkeiten ihrer Aminosäure-Sequenz, die trotz allem lediglich moderate Homologien aufweisen. Andererseits bezieht die Einteilung die katalytischen Eigenschaften dieser Sulfotransferasen mit ein, wobei zwischen 50 und 95% Sequenz-Homologie zwischen Vertretern mit ähnlichen Substrat-Anforderungen vorliegt (Review in Bowman und

Bertozzi, 1999). Die Kohlenhydrat Sulfotransferasen weisen eine hohe Substratspezifität auf. Die biologische Relevanz vieler dieser Enzyme (z. B. C4ST3, D4ST-1, GAL3STs, NDST3, NDST4) ist noch wenig verstanden.

1.2.3 Humane Tyrosylprotein Sulfotransferasen und die Sulfatierung von Proteinen

Die Tyrosylprotein Sulfotransferasen katalysieren die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten in Proteinen, die sich in der Sekretionsmaschinerie befinden. Diese posttranslationale Modifikation zieht funktionale Konsequenzen nach sich, da sie u.a. in einer Reihe von Krankheitsprozessen eine Rolle spielt. Dazu gehören die akute und die chronische Inflammation, die Tumorzellen-Metastasierung und die mikrobielle Pathogenese. Auf diese Beispiele wird im Abschnitt 1.4 näher eingegangen. Im Menschen wird diese Reaktion von zwei Vertretern der Tyrosylprotein Sulfotransferasen katalysiert. Sie werden im Abschnitt 1.5 gesondert beschrieben.

1.3 Struktur und Reaktionsmechanismus von Sulfotransferasen

1.3.1 Struktur von humanen Sulfotransferasen

Von den beschriebenen 35 humanen zytosolischen, zehn humanen Kohlenhydrat und zwei humanen Tyrosylprotein Sulfotransferasen ist von vier Proteinen die Struktur durch Röntgen-Kristallisation ermittelt wurden (Abb.1.2). Dies sind *hSULT1A3* (humane zytosolischen Catecholamin Sulfotransferase; Bidwell *et al.*, 1999; Dajani *et al.*, 1999a), *hSULT1E1 V269E-Mutante* (humane zytosolische Östrogen Sulfotransferase; Pedersen *et al.*, 2002), *hSULT2A1* (humane zytosolische Dehydroepiandrosteron Sulfotransferase; Pedersen *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001) und *hNDST1* (Sulfotransferase Domäne der humanen Kohlenhydrat Heparan Sulfat N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1; Kakuta *et al.*, 1999).

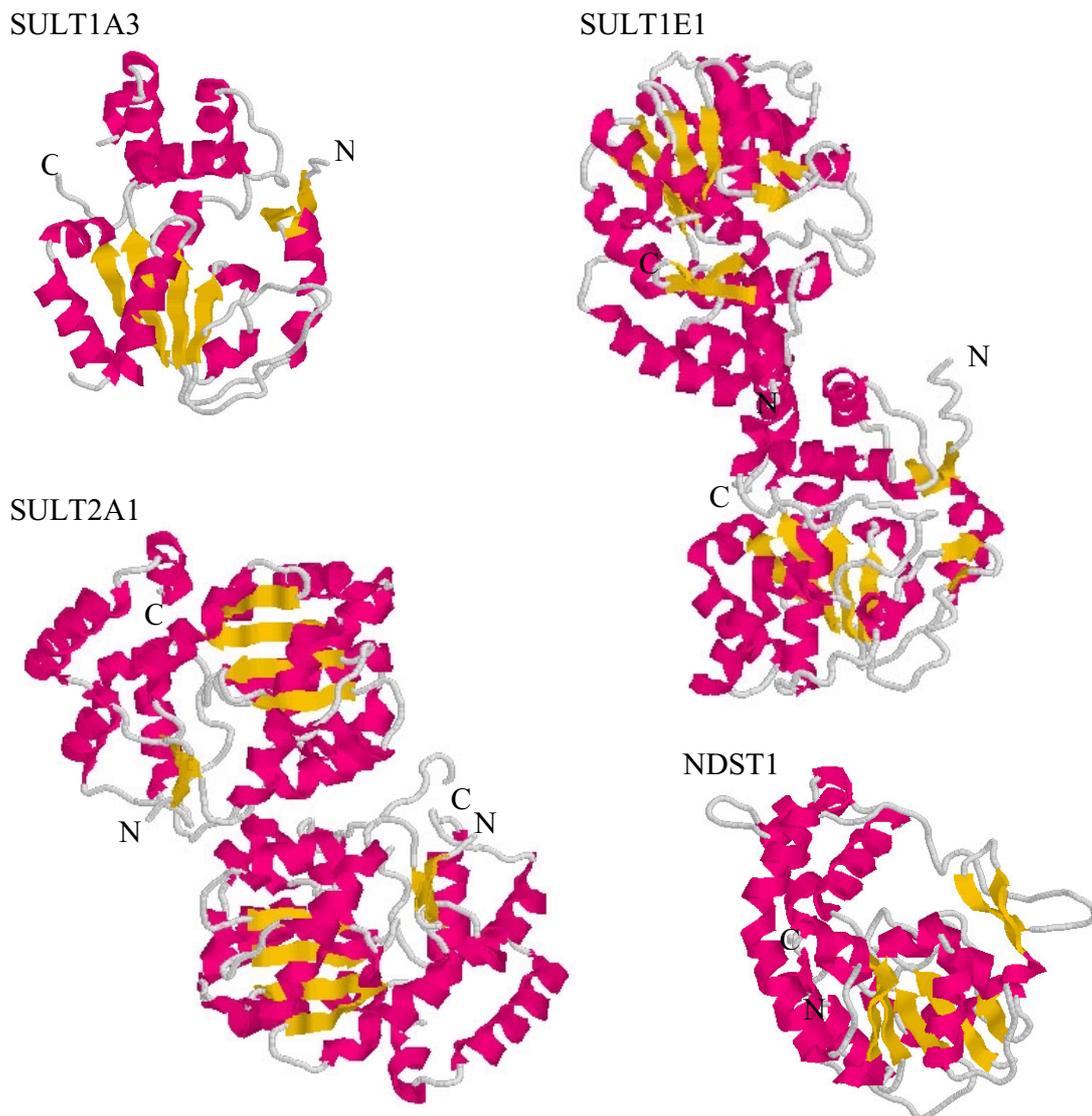


Abb.1.2 Kristallstrukturen von *hSULT1A3*, *hSULT1E1*, *hSULT2A1* und *hNDST1*. Dargestellt sind die sekundären Strukturen der Sulfotransferasen, α -Helices in magenta, β -Faltblätter in gelb. *hSULT1E1* und *hSULT2A1* sind als Dimere abgebildet, *hSULT1A3* und *hNDST1* als Monomere. Die Strukturen wurden aus der Brookhaven Datenbank bezogen.

Obwohl zytosolische und Golgi-Sulfotransferasen keine Sequenz-Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene besitzen ($\approx 20\%$ Identität), zeigen Sequenz-Vergleiche und Vergleiche der Kristallstrukturen zwei konservierte Abschnitte, die charakteristisch für sämtliche Sulfotransferasen sind (Kakuta *et al.*, 1998) (Abb.1.3).

		PSB-Loop
SULT1A3	---MELIQDTSRPPLEYV--KGVPLIKY-F-AEALGPL---QSFQARPDDLIN	TYPKSG
SULT1E1	---MNSELDY-YEKFEV--HGILMYKD-F-VKYWDNV---EAFQARPDDLVIAT	TYPKSG
SULT2A1	GIPRNSRVDS--DDFLWF--EGIAFPTMGFRSETLRKVR--DEFVIRDEDVIL	TYPKSG
NDST1	-LQTLPPVQLAQKYFQIFSEEKDPWQDPCEDKRHKDIWSKEKTCDRFPKLLI	GPQKTG
SULT1A3	TTWVSQIILDMIYQGGDLEKCNRAPIYVRVPFLEVNDPGEPSGLETLKDT-PPPR-----	
SULT1E1	TTWVSEIVYMIYKEGDVEKCKEDVIFNRIPFLECRKENLMNGVKQLDEM-NSPR-----	
SULT2A1	TNWLAEILCLMHSKGDAKWIQSVPIWERSPWVES-----EIGYTALSET-ESPR-----	
NDST1	TT-ALYLFLGMHPDLSSNYP-SSETFEEIQFFNG-HNYHKGIDWYMEFFPIPSNTTSD	
		3'-PB-Motiv
SULT1A3	LIKS---HLPLALLP--QTLDDQKVKVYVAARNPKDVAVS	YYHFHRMEK-----AHP
SULT1E1	IVKT---HLPPELLP--ASFEKDKCI IYLORNAKDVAVS	FYYFFLMVA-----GHP
SULT2A1	LFSS---HLP IQLFP--KSFFSSKAKVIYLMRNPRDVLVS	GYFFWKNMK-----FLK
NDST1	YFEKSANYFDSEVAPRRAAALLPKAKVLTII	INPADRAYSWYQHQRADDDPVALKYTFHE
SULT1A3	--EPGTWDSFLEKFMAGEVSYGSWYQ-HVQEWELSRTHPVLVLYFYEDMKENPKREIQKI	
SULT1E1	--NPGSFPEFVEKFMQGQVPYGSWYK-HVKSWEKKGKSPRVLFLFYEDLKEDIRKEVIKL	
SULT2A1	--KPKSWEEYFEWFCQGTVLYGSWFD-HIHGWMPMREEKNFLLLSYEELKQDTGRTIEKI	
NDST1	VITAGSDASSKLRALQNRCLVPGWYATHIERWLSAYHANQILVLDGKLLRTEPAKVMDMV	
SULT1A3	LEFVGRS---LPEETMDFMVQHTSFKEMKKNPMTNYTTVPQELMDHSISPFRKGMAGD	W
SULT1E1	IHFLEK---PSEELVDRI IHHTSFQEMKNNPSTNYTTLPDEIMNQKLSPFMRKGITGD	W
SULT2A1	CQFLGKT---LEPEELNLILKNSFQSMKENKMSNYLLSVDYVVDKTQ-LLRKGVS	GDW
NDST1	QKFLGVTNTIDYHKTLAFDPKKGFWCQLLEGGKTKCLGKSKGRKYPEMDLDSRAFLKDY	
		KTVE-Motiv
SULT1A3	KTTFVAQNE	RFDADYAEKMAGCSLS-FRSEL
SULT1E1	KNHFTEALNE	KFDKHYEQQMKESTLK-FRTEI
SULT2A1	KNHFVAQA	EDFKLFQEKMADLPRELFPE-
NDST1	RDHN-IELSKLLYKMG-QTLPTWLREDLQNT	

Abb.1.3 Sequenzvergleich der kristallisierten humanen Sulfotransferasen *hSULT1A3*, *hSULT1E1*, *hSULT2A1*, *hNDST1*. Hervorgehoben sind der PSB-Loop, das 3'-PB-Motiv und das KTVE-Motiv. Der Vergleich wurde mit dem Programm CLUSTAL W (1.74) von www.embnet.ch erstellt.

In der N-terminalen Region ist dies ein Abschnitt, der als PSB-Loop bezeichnet wird und der mit der 5'-Phosphatgruppe des PAPS interagiert. Im mittleren Sequenzabschnitt befindet sich eine konservierte Region, die als 3'-PB-Motiv bekannt ist. In diesem Motiv finden sich neben gut (Arginin-Rest) bzw. vollständig (Serin-Rest) konservierten Aminosäuren zwei bis drei weitere, die mit der 3'-Phosphatgruppe von PAPS interagieren. Sie sind an der selektiven Bindung und an der Orientierung von PAPS beteiligt.

Die vier kristallisierten humanen Sulfotransferasen zeigen globuläre Strukturen mit einer einzelnen α/β Domäne. Letztere besitzt ein charakteristisches vier- bis fünf-strängiges β -

Faltblatt, das die PAPS-Bindungsstelle und das katalytische Zentrum bildet. Dieses Faltblatt wird auf beiden Seiten von α -Helices flankiert. Im Gegensatz zur hochkonservierten PAPS-Bindungsstelle und dem katalytischen Zentrum ist die Substrat-Bindungsstelle zwischen der Golgi-Sulfotransferase und den drei zytosolischen Sulfotransferasen unterschiedlich. Die zytosolischen Sulfotransferasen besitzen eine tiefe, hydrophobe Tasche, während die Substrat-Bindungsstelle der Golgi-Sulfotransferase NDST1 ein langer, offener Spalt ist. Diese strukturellen Unterschiede der Substrat-Bindungsstellen beider Sulfotransferase-Familien spiegeln die chemischen und strukturellen Eigenschaften ihrer Substrate wieder, die bei den zytosolischen Sulfotransferasen aus kleinen, flachen Ringsystemen bestehen und bei den Golgi-lokalisierten Kohlenhydrat Sulfotransferasen aus langgestreckten Protein-gebundenen Zuckerketten. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Golgi-Sulfotransferase in der Nähe des C-Terminus ein zusätzliches drei-strängiges anti-paralleles β -Faltblatt besitzt, das in einen unstrukturierten Proteinbereich übergeht. Beide Regionen gehen Interaktionen mit einem kokristallisierten PAP-Molekül ein (Kakuta *et al.*, 1999). Das β -Faltblatt bildet eine einzelne, für die Funktion essentielle Disulfid-Brücke aus (Wei *et al.*, 1999).

Die bisher bekannten zytosolischen Sulfotransferasen bilden in Lösung Homodimere (Petrotchenko *et al.*, 2001). Die durch Vergleiche gefundene Dimerisierungs-Sequenz ist: KxxxTVxxxE und wird das KTVE-Motiv genannt. Dieses Motiv befindet sich in einer Loop-Region nahe des C-Terminus (von Trp²⁵⁴ bis Glu²⁶⁴ der humanen SULT1E1). Es bildet vier Wasserstoffbrücken zwischen den Protein-Rückgraten der beiden Monomere und auf jeder Seite flankierende Ionen-Paare zwischen Lys²⁵⁵ und Glu²⁶⁴ (Nomenklatur der humanen SULT1E1). Die physiologische Bedeutung der Dimerisierung in Bezug auf die Funktion der zytosolischen Sulfotransferasen ist noch unklar.

Die gelösten Kristallstrukturen der Sulfotransferasen weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit Nukleotidkinasen auf, die den Transfer einer Phosphoryl-Gruppe mit ATP als Donor katalysieren (Kakuta *et al.*, 1997). Diese Ähnlichkeiten finden sich einerseits in der Anordnung ihrer Sekundärstrukturen und andererseits in ihrer Kernstruktur und könnten auf eine Koevolution des Sulfat- und Phosphat-Metabolismus basierend auf ähnlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften hinweisen (Negishi *et al.*, 2001).

1.3.2 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Sulfotransferasen

Der in Abb.1.4 dargestellte Reaktionsmechanismus basiert auf frühen kinetischen Sulfuryl-Transfer-Untersuchungen (Leyh, 1993; Duffel, 1997) und den vorliegenden Kristallstrukturen von humanen Sulfotransferasen (Bidwell *et al.*, 1999; Kakuta *et al.*, 1999; Dajani *et al.*, 1999a; Pedersen *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002). Die Bezeichnung der Aminosäure-Reste ist für *hSULT1E1* angegeben.

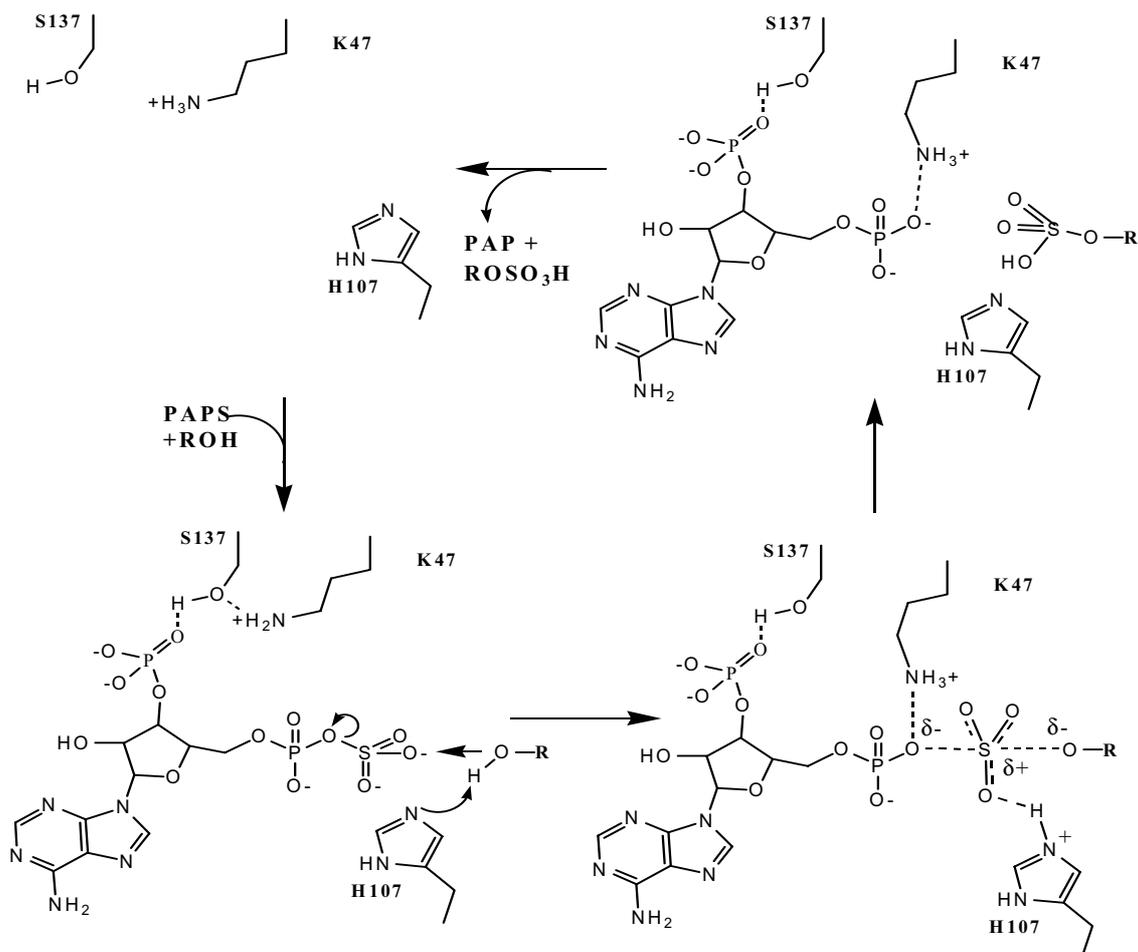


Abb.1.4 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für den Sulfuryl-Transfer durch Sulfotransferasen.

Drei Aminosäure-Reste sind im katalytischen Zentrum konserviert: Serin137 (S137), Lysin47 (K47) und Histidin107 (H107). H107 fungiert als katalytische Base und entfernt das Proton der Akzeptor OH-Gruppe. Das daraus entstehende starke Nukleophil greift das Schwefel-Atom von PAPS an. Dies wiederum führt zu einer negativen Ladung am überbrückenden Sauerstoff-Atom zwischen dem 5'-Phosphat-Atom und dem Schwefel-

Atom. K47 bildet dabei zunächst eine Wasserstoffbrücke mit S137. Nach Substrat-Bindung und Etablierung einer negativen Ladung am überbrückenden Sauerstoff-Atom stabilisiert S137 über eine Wasserstoffbrücke die 3'-Phosphatgruppe von PAPS. Die Aminogruppe von K47 bildet eine neue Wasserstoffbrücke zum überbrückenden Sauerstoff-Atom aus. Dies führt zur Dissoziation der Sulfuryl-Gruppe von PAPS. Im letzten Schritt verlassen PAP und das sulfatierte Substrat das katalytische Zentrum.

In der Golgi-lokalisierten NDST1 findet sich statt des Histidyl-Restes ein Glutamyl-Rest (Glu642), der als katalytische Base fungiert. Es wird angenommen, dass der katalytische Mechanismus ähnlich ist.

1.4 Physiologische Bedeutung der Sulfatierung von Tyrosyl-Resten

In Abschnitt 1.2.3 wurde bereits kurz auf die Bedeutung der Sulfatierung von Tyrosyl-Resten in Proteinen, die sich in der Sekretionsmaschinerie befinden, eingegangen. In diesem Abschnitt sollen deshalb einige wichtige Proteine, für deren Funktion die Sulfatierung entscheidend ist, vorgestellt werden.

Der Tyrosyl-Rest ist der einzige Aminosäure-Rest, der *in vivo* sulfatiert wird. Diese posttranslationale Modifikation erfolgt im Golgi-Apparat und ist die häufigste chemische Veränderung dieser Aminosäure (Niehrs *et al.*, 1994). Sie tritt in vielen sezernierten oder Membran-gebundenen Proteinen multizellulärer Organismen auf.

In den letzten Jahren hat sich die Anzahl der nachgewiesenen sulfatierten Tyrosyl-Reste stark erhöht. Die exakte physiologische Bedeutung dieser Modifikation ist in vielen Fällen noch ungeklärt, sie scheint allerdings Protein-Protein Interaktionen zu beeinflussen. Einen Einfluss der Sulfatierung konnte in so entscheidenden biologischen Prozessen wie der Leukozyten-Adhäsion, der Blutgerinnung, der Chemokin-vermittelten Signaltransduktion und bei dem Eintritt von HIV in die Leukozyten nachgewiesen werden.

Leukozyten werden an Entzündungsherden aus dem Blutstrom rekrutiert und wandern in das umgebende Gewebe ein. Dieser Vorgang beginnt mit dem Leukozyten-„Rolling“, der durch die Wechselwirkung von P-Selektin an aktivierten Endothelzellen mit dem P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) an Leukozyten vermittelt wird (Norman *et al.*, 1995; Borges *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999). PSGL-1 enthält außer Glykosylierungen,

die für die Interaktion zwischen beiden Molekülen notwendig sind, drei sulfatierte Tyrosyl-Reste am N-Terminus. Diese erhöhen wesentlich die Stärke der Bindung zwischen Leukozyt und Endothelzelle und garantieren damit die effiziente Bekämpfung von Entzündungen (Pouyani und Seed, 1995; Sako *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1995; De Luca *et al.*, 1995).

Die Tyrosyl-Sulfatierung spielt auch bei der Blutgerinnung eine Rolle. Werden Blutgefäße verletzt, verbindet der von Willebrand Faktor (vWF) das subendotheliale Kollagen mit dem GP Ib α (Glykoprotein Ib α), einem Membran-Protein der Blutplättchen, und löst damit die Blutgerinnung aus (Savage *et al.*, 1998; Clemetson, 1999). Die Blutplättchen-Bindung an den vWF ist dabei abhängig von der Sulfatierung dreier GP Ib α Tyrosyl-Reste (Dong *et al.*, 1994). Eine mögliche Rolle der Tyrosyl-Sulfatierung bei der Entstehung von Gefäß-verschließenden Plaques kann deshalb angenommen werden und wird durch weitere Beispiele verstärkter Interaktionen aufgrund von Sulfatierung bei der Blutgerinnung untermauert. Dazu gehören nachgewiesene Bindungen zwischen vWF und Faktor VIII (Leyte *et al.*, 1991), Fibronectin und Fibrin (Suiko und Liu, 1988) und Thrombin und den Faktoren V und VIII (Hortin, 1990). Aber auch auf Sulfotyrosinen basierende Interaktionen zwischen Thrombin und Hirudin (Niehrs *et al.*, 1990b) und Thrombin und Heparin Kofaktor II (Hortin, 1990) sind bekannt.

Im Jahre 1999 wurde der erste Nachweis sulfatierter Tyrosyl-Reste an Chemokin-Rezeptoren erbracht. Die Sulfo-Tyrosine erwiesen sich als notwendig für effektive Funktionsausübung der Rezeptoren (Farzan *et al.*, 1999). Chemokine sind kleine, sezernierte Proteine, die am Leukozyten-„Trafficking“, an der Angiogenese, an der Angiostase, an der Abwehr von viralen Infektionen und an der Immunantwort bei Krebs und bei Metastasierung beteiligt sind (Zlotnik *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001). Farzan *et al.* konnten nachweisen, dass die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 an Tyrosyl-Resten sulfatiert sind (Farzan *et al.*, 1999). Neben der Bindung nativer Chemokine fungiert CCR5 als Korezeptor für HIV (Humanes Immundefizienz-Virus). Die Sulfatierung vermittelt zusammen mit dem Rezeptor CD4 die Anheftung von HIV an die Zellen (Doranz *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996). Durch Mutation der vier Sulfotyrosyl-Reste in CCR5 zu Phenylalanin konnte der Eintritt des Virus in die Zellen (in Kultur) um

50 -75% vermindert werden (Farzan *et al.*, 1999). Das macht einen Einsatz von Inhibitoren der Tyrosyl-Sulfatierung oder von mit HIV kompetierenden Peptiden als anti-HIV-Therapeutikum denkbar.

Der zweite erwähnte, sulfatierte Chemokin-Rezeptor CXCR4 fungiert ebenfalls als wichtiger HIV-Korezeptor (Farzan *et al.*, 1999). Außerdem ist die Expression des Rezeptors in humanen Brustkrebs-Zellen hochreguliert (Muller *et al.*, 2001). Die Expression des dazugehörigen Liganden CXCL12/SDF-1 α zeigt ebenfalls Maximalwerte in dem kranken Organ. Beides zusammen repräsentiert die erste Bestimmung von Brustkrebs-Metastasierung. Wird *in vivo* die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor neutralisiert, so wird die Metastasierung von Lymphknoten und Lunge verringert. In malignen Melanomen wird ein ähnlicher Prozess diskutiert. Damit kann den Chemokinen und ihren sulfatierten Rezeptoren eine kritische Rolle der Ziel-Bestimmung der Metastasierung zugeschrieben werden. Ob weitere Chemokin-Rezeptoren sulfatierte Tyrosyl-Reste besitzen, bleibt abzuwarten.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Sulfatierung von einem von zwei Tyrosyl-Resten in der N-terminalen extrazellulären Domäne verschiedener Rezeptoren von Glykoprotein-Hormonen (Thyrotrophin-Rezeptor (TSHr), Luteinisierendes Hormon/Chorion Gonadotrophin Rezeptor (LH/CGr), Follikel-stimulierendes Hormon-Rezeptor (FSHr)) für die hoch-affine Bindung des Liganden an die Rezeptoren notwendig ist (Costagliola *et al.*, 2002).

Quantifizierungen des Gesamt-Protein-Pools von Zellen haben ergeben, dass eine Sulfatierung an ca. 1% aller Tyrosyl-Reste erfolgt und dass in Abhängigkeit vom Zelltyp 65 – 92% der an Protein gebundenen Sulfo-Tyrosine sezerniert werden (Bauerle und Huttner, 1985). Es ist somit zu erwarten, dass weitere biologisch relevante Funktionen auf Sulfotyrosin vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen.

1.5 Humane Tyrosylprotein Sulfotransferasen (TPST)

Die O-Sulfatierung von Tyrosyl-Resten wird von Tyrosylprotein Sulfotransferasen (TPST) katalysiert (Huttner, 1982). Die Beschreibung dieser enzymatischen Aktivität erfolgte 1983 erstmalig in PC12-Zellen durch Lee und Huttner (Lee und Huttner, 1983).

Die Anreicherung des Proteins aus dem Nebennierenmark des Rindes gelangen Niehrs und Huttner sieben Jahre später (Niehrs und Huttner, 1990a).

Es dauerte noch einmal 8 Jahre, bis gleich zwei humane TPST-Isoformen (*hTPST1* und *hTPST2*) bestehend aus 370 bzw. 377 Aminosäure-Resten auf DNA-Ebene identifiziert wurden (Beisswanger *et al.*, 1998; Ouyang *et al.*, 1998a; Ouyang und Moore, 1998b). Die in diesen Arbeiten durchgeführten Northern-Analysen zeigten, dass beide Isoformen in allen untersuchten Geweben exprimiert werden. Bisher allerdings erfolgten keine Angaben darüber, ob die Isoformen in einzelnen Zellen koexprimiert werden.

Beide Proteine besitzen eine 67%-ige Aminosäure-Identität zueinander ($\approx 20\%$ Identität gegenüber anderen Sulfotransferasen) und sind Membran-gebundene, N-glykosylierte Golgi-Enzyme mit einer luminalen katalytischen Domäne, einer einzelnen Transmembranhelix und einem kurzen zytosolischen N-Terminus. Die exakte Lokalisation der TPSTs wird im *trans*-Golgi-Netzwerk vermutet (Baeuerle und Huttner, 1987). Dafür konnten allerdings nur indirekte Beweise wie die Proteinstruktur, Golgi-Präparationen, pH-Optimum der Proteine (pH 6,0 - 7,0; Niehrs *et al.*, 1990a; William *et al.*, 1997; Ramaprasad und Kasinathan, 1998b) und Solubilisieren mit Hilfe von Triton X-100 angeführt werden. Ein direkter Nachweis (z.B. durch Expression GFP-markierter Proteine oder Immunfärbung) ist bisher nicht veröffentlicht.

Obwohl keine gelöste 3D-Struktur von den TPSTs vorliegt, konnten aufgrund von Sequenzvergleichen mit anderen Sulfotransferasen der PSB-Loop, der als eindeutiges Merkmal der Sulfotransferasen gilt, identifiziert werden. (Rabiller, 2002)

Beide TPSTs scheinen konstitutiv aktiv zu sein (Kehoe und Bertozzi, 2000). Über die Regulation der Expression der Proteine ist wenig bekannt. Eine Erhöhung des TPST-Niveaus aufgrund erhöhter Protein-Expression wird Ethanol zugesprochen (Kasinathan *et al.*, 1998; Ramaprasad und Kasinathan, 1998a). Jedoch muß aufgrund der enormen biologischen Relevanz der Sulfatierung von Tyrosyl-Resten insbesondere in einer Reihe von Krankheitsprozessen wie der Inflammation, der Tumorzellen-Metastasierung und der mikrobiellen und viralen Pathogenese die Expression beider Isoformen vor allem in an den Blutstrom angrenzenden Zellen streng reguliert sein. Untersuchungen liegen dazu bisher jedoch nicht vor.

Die Existenz von mehr als einer *hTPST*-Isoform könnte eine Erklärung für die Vielfalt der Substrate sein (siehe Abschnitt 1.4). Die darin zu sulfatierenden Tyrosyl-Reste sind von sauren Aminosäure-Resten umgeben und müssen für die TPSTs zugänglich sein (Nicholas, Jr. *et al.*, 1999). Die darüber hinausgehende Substrat-Spezifität der beiden Isoformen wurde bisher nur in Ansätzen untersucht. So konnten Ouyang und Moore 1998 zeigen, dass Zelllysate aus transfizierten 293-T-Zellen, die entweder HPC4-*hTPST1*- bzw. HPC4-*hTPST2*-Fusionsproteine exprimierten (Fusion mit NH₂-terminalem Epitop, einem Ca²⁺-abhängigen monoklonalen Antikörper zu Protein C), Peptide mit bekannten Tyrosyl-Sulfatierungssequenzen unterschiedlich stark als Substrat akzeptierten (Ouyang *et al.*, 1998b). Sie beobachteten, dass ein Peptid mit einer bekannten Tyrosyl-Sulfatierungsstelle von der α -Kette der vierten Komponente des Komplements (C4 α) von *hTPST1* neunmal besser sulfatiert wird als von *hTPST2*. Ein Peptid mit der Sequenz für Tyrosyl-Sulfatierung von PSGL-1 wurde dagegen von beiden Isoformen in gleichem Maße sulfatiert. Seibert *et al.* konnten 2002 das Sulfatierungsmuster eines Peptides, das den N-Terminus des Chemokin-Rezeptors CCR5 darstellt, beschreiben (Seibert *et al.*, 2002). Sie stellten fest, dass das Peptid an seinen vier Tyrosyl-Resten von beiden Isoformen sulfatiert wird. Die Sulfatierung erfolgte schrittweise und zeigte einige Unterschiede in der Geschwindigkeit der Sulfatierung der einzelnen Tyrosyl-Reste bezogen auf TPST1 und TPST2. Allerdings konnten aufgrund des schnellen Aktivitätsverlustes der TPSTs keine endgültigen und weitreichenden Aussagen getroffen werden.

Außer den hier beschriebenen Versuchen mit Peptiden finden sich in der Literatur keine Angaben über mögliche Substrat-Spezifitäten. Ebenso wurden keine Untersuchungen mit den natürlichen Substraten, den Proteinen, durchgeführt.

Die Expression einer sezernierten und aktiven *hTPST2*-Mutante (ohne zytosolische Domäne und Transmembranhelix) in einer humanen, embryonalen Nieren-Zelllinie (HEK293-T) gelangen Ouyang und Moore 1998 (Ouyang *et al.*, 1998b). Seibert *et al.* benutzten diese Technik zur Expression und Anreicherung von löslichem *hTPST1* und *hTPST2* und führten mit den so gewonnenen Proteinen ihre bereits beschriebenen Untersuchungen zum Sulfatierungsmuster des N-terminalen CCR5-Peptides durch (Seibert *et al.*, 2002). Daten, die die Anreicherung der Proteine dokumentieren, sind in

beiden Veröffentlichungen nicht gezeigt. Ouyang und Moore verzichteten zusätzlich auf den Aktivitäts-Nachweis.

Kehoe *et al.* nutzten ebenfalls die von Ouyang und Moore eingeführte Methode zur Expression von *hTPST2* (Kehoe *et al.*, 2002). Das von den verwendeten CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary Zellen“) durch Sekretion mit *hTPST2* angereicherte Medium wurde in einem Screen zur Entwicklung von *hTPST2*-Inhibitoren verwendet. Kehoe *et al.* synthetisierten mit Hilfe der kombinatorischen Chemie zwei Inhibitoren (Kehoe *et al.*, 2002). Sie verwendeten eine Technik, mit der Inhibitoren von Proteinen identifiziert werden können, für die noch keine Leitstruktur („lead compound“) und keine strukturellen Informationen vorliegen. Dazu wurde im ersten Schritt eine Bibliothek aus 305 Aldehyd-Monomeren hergestellt, die mit einer Konzentration von 1 mM gegen *hTPST2* untersucht wurden. Über einen Linker wurden aus 18 Monomer-Komponenten mit wenigstens 25% Inhibitor-Aktivität 171 Dimere-Kombinationen hergestellt. Die beiden besten Inhibitoren nach erneuter bestimmter Inhibitoraktivität zeigten IC_{50} -Werte von 30 μ M bzw. 40 μ M. Die Bindung an *hTPST2* ist zumindest für einen der beiden Inhibitoren reversibel. Beide Komponenten inhibieren allerdings sowohl Kohlenhydrat Sulfotransferasen als auch Zytosolische Sulfotransferasen und können deshalb nicht als spezifische *hTPST2*-Inhibitoren angesehen werden. Außerdem ist nicht geklärt, ob die Komponenten Zugang zum Golgi-Apparat haben.

Obwohl die Tyrosyl-Sulfatierung von Proteinen einen starken Einfluss auf ihre biologische Funktion ausübt, ist der Knock-out von TPST1 in Mäusen nicht lethal (Ouyang *et al.*, 2002). Die Mäuse weisen ein um 5% reduziertes Körpergewicht auf, und *TPST1*^{-/-} Weibchen haben signifikant weniger Nachkommen, da ein Teil der Föten zwischen Tag 8,5 und 15,5 *post coitum* stirbt. Ob der TPST1-Knock-out die Blutgerinnung oder die Entzündungsbekämpfung beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ebenso wurde die Expressionsrate von TPST2 nicht bestimmt.

Wie diese Aufstellung zeigt, ist selbst nach 20 Jahren intensiver Forschung über die TPSTs wenig bekannt. Ihre allgemeine physiologische Bedeutung kann deshalb nur errahnt werden. Aus diesem Grund wurde ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf biologisch relevante Fragestellungen gelegt.

1.6 Schubspannung als Regulator von Genexpression

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Bekannte Risiken sind Bluthochdruck, hoher Cholesterinspiegel, Rauchen, Diabetes mellitus, Fettleibigkeit, Bewegungsmangel, Stress, hohes Alter und das Geschlecht (Männer sind mit erhöhtem Risiko behaftet). Durch die Risikofaktoren kommt es unter anderem zu einer zunehmenden Störung der Funktionalität der Gefäßwand, die schließlich zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Diese ist durch eine Verringerung der Stickstoff-Verfügbarkeit infolge oxidativen Stresses, gesteigerter Vasokonstriktion, Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten, Akkumulation von intra- und extrazellulären Lipiden, Monozyten/Makrophagen-Infiltration und vermehrte Proliferation glatter Muskelzellen gekennzeichnet. Fortschreitend kommt es zunehmend zur Schaumzellbildung, Akkumulation von Bindegewebsproteinen und im Spätstadium zur Kalziumeinlagerung in die Gefäßwand (Ross, 1999).

Viele Substrate der TPSTs sind Proteine, die bei diesem Vorgang eine entscheidende Rolle spielen. Außerdem sind sie bei der Gefäßneubildung, der Blutgerinnung und der Entzündungshemmung beteiligt. Diese Substrate stellen Rezeptoren und Liganden dar, die häufig von den Endothelzellen der Gefäßwand gebildet und anschließend in der Plasmamembran dieser Zellen verankert oder sezerniert werden. Die Endothelzellen unterliegen *in vivo* permanent biomechanischen Kräften wie der Schubspannung, die durch den Blutfluss hervorgerufen werden. Schubspannung auf physiologischem Niveau ist an der Regulation des vaskulären Tonus und an der Erhaltung der vaskulären Integrität beteiligt und wird als protektiver Mechanismus gegen die Lokalisation von atherosklerotischen Plaques betrachtet (Traub und Berk, 1998; Gimbrone, Jr. *et al.*, 2000). Endothelzellen verändern unter Schubspannung ihre Form, schütten vasoaktive Peptide aus, reduzieren ihr Apoptose-Risiko und verändern flussabhängig ihre Genexpression (Davies *et al.*, 1997; Topper und Gimbrone, Jr., 1999).

Schubspannung stellt somit einen wichtigen Regulator der Genexpression in Endothelzellen dar. Trotzdem viele biologisch sehr wichtige TPST-Substrate von Endothelzellen exprimiert und sezerniert werden, ist der Einfluss von Schubspannung auf die Expression der TPSTs bisher nicht untersucht wurden.

1.7 Zielstellung der Arbeit

TPSTs beeinflussen durch ihre Substrate eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Trotz ihrer Bedeutung ist bisher wenig über diese Enzyme bekannt. In dieser Arbeit sollte deshalb die Lokalisation der TPSTs abschließend geklärt werden. Außerdem ist wenig über die Regulation der TPSTs und der Einfluss einer geänderten TPST-Expression auf die Substrate bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss eines wichtigen Regulators der Angiogenese, der Blutgerinnung und der Entzündungshemmung – die Schubspannung – auf die TPST-Expression untersucht werden. Weiterhin sollten beide Isoformen löslich und aktiv exprimiert werden, um Substrat-Spezifitäts-Untersuchungen und Strukturaufklärung in der Arbeitsgruppe zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien im Reinheitsgrad „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen).

2.1.2 Molekularbiologische Produkte

a) Standards

100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/M.)
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/M.)
Mark 12 Protein Standard	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

b) Kits

QuikChange [™] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene [®] Europe (Amsterdam, Die Niederlande)
Rapid Translation System RTS 500 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
EasySelect [™] <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Bac-N-Blue [™] Transfection Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf)
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
HiSpeed [™] Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
EndoFree [®] Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
BigDye [™] Terminator Kit	Applied Biosystems (Foster City, Cali- fornien, USA)

c) Enzyme

Restriktions-Endonukleasen: BamH I (20 U/ μ l), EcoR I (20 U/ μ l), Nco I (10 U/ μ l), Nde I (20 U/ μ l), Pme I (10 U/ μ l), Pst I (20 U/ μ l), Xba I (20 U/ml), Xho I (20 U/ μ l)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/M.)
SuperScriptII RNase H- Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Diagonal (Münster)
Cloned <i>Pfu</i> (5 U/ μ l)	Stratagene [®] Europe (Amsterdam, Die Niederlande)
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/M.)

d) Antikörper

anti- <i>h</i> TPST1 Δ TMD-Antikörperserum	polyklonal, aus Kaninchen, zweite Abnahme, Titer 1:1000, BioGenes GmbH (Berlin)
anti-Histidin-Tag Antikörper	aus Maus, Dianova GmbH (Hamburg)
anti-His Antibody Selector Kit	aus Maus, QIAGEN GmbH (Hilden)
anti-c-Myc Antikörper	aus Maus, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Kalifornien, USA)
anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert	aus Ziege, Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
anti-Maus-IgG, Peroxidase-konjugiert	aus Ziege, Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)

e) Primer

Sämtliche Primer wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) zur Synthese bestellt. Eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktions-Endonukleasen sind unterstrichen, die Enzyme sind in Spalte 3 vermerkt (Tab.1).

Tab.1 Verwendete Primer mit Angabe der verwendeten Schnittstelle

Primer-Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
T7 Promotor	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGG	
T7 Terminator	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG	
S-Tag18mer	GAACGCCAGCACATGGAC	
Baculovirusforward	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG	
Baculovirusreverse	ACTTCAAGGAGAATTTCC	
5?AOX1_Pichia-long	AATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGC	
3?AOX1_Pichia-long	CAGGCAAATGGCATTCTGACATCC	
TPST1-02a	CCCCCCTCGAGCTACTC	Xho I
TPST1-05s	TGTTTTCCATGGGCCAGCATGCTATGGAATG	Nco I
TPST1-06a	GCAATACTGAGTGGTTCCAGGGAATCTGGAGGAACTTAAG	
TPST1-07s	CTTAAAGTTCCTCCAGATTCCCTTGGAACTCAGTATTGC	
TPST1-08s	GTGTTTGGATCCGGGCCAGCAT	BamH I
TPST1-kurz	ATGCCAAATTTCTCCTGATGG	
TPST1-kurz	AAACATCTGGCGGTATCTTCC	
TPST1-Sf01s	GTGTTTGGATCCGGGCCAGCAT	BamH I
Pichia-01s	GTGTTTTCTGCAGGCCAGCATGCC	Pst I
Pichia-02a	CCCCCTCTAGAGCCTCCACTTGC	Xba I
TPST1wtL_1s	GGATCCCTCGAGATGGTTGGAAAGC	Xho I
TPST1L_3a	CCCTCCGGATCCTCCACTTGC	BamH I
TPST2-02a	GATATCGAATTCACGAGCT	EcoR I
TPST2-03s	CGGTTCCCATGGGACAGCAG	
TPST2200601MetNcoI	GGAGCCCCTATGGGGCCATGC	Nco I
TPST2200601 CysNcoI	GTTCCCCTATGGGACAGCAGGTGCTAGAGGGCCGGC	Nco I
TPST2-kurz	CAAGCTCATCCTCGACTTCC	
TPST2-kurz	TGTGTTGTTGATGACGAAGG	
Pichia_03s	GCGGTTCTGCAGGACAGCAGG	Pst I
Pichia_04as	GATATCTCTAGAGCCGAGCTTCC	Xba I
hirudinNde1s	TATGGTTACCTACACTGACTGCACTGAATC	Nde I
hirudin1s	CGGTCAGAACCCTGTGCCTGTGCGAAGGCTCTAACGTTTG	
hirudin2s	CGGCAAGGGCAACAAATGCATCCTGGGCTCTAACGGCAAGG	
hirudin3s	GCAACCAGTGCCTTACTGGCGAAGGTACCCCGAACC	
hirudin4s	GAGTCTCACAACGACGGCGACTTCGAAGAAAATCCC	
hirudinXho1s	GGAAGAATACCTGCAGTAATAAAC	Xho I
hirudinNde1as	GCACAGGTTCTGACCGGATTCAGTGCAGTCAGTGTAGGTAACA	Nde I
hirudin1as	GAAGTCGCCGTCGTTGTGAGACTCCGGTTTCGGGGTACCTTG	
hirudin2as	CCAGTAACGCAGCTGGTTGCCCTTGCCGTTAGAGCCCAGGATG	
hirudin3as	CATTTGTTGCCCTTGCCGCAAACGTTAGAGCCTTCGCACAG	
hirudinXho1as	TCGAGTTTATTACTGCAGGTATTCTCCGGGATTTCTTC	Xho I

(A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin)

f) Vektoren / Konstrukte / Plasmide

pBlueScriptII KS(+) <i>hTPST1</i>	Dr. Lorenz Mayr (Novartis International AG, Basel, Schweiz)
pBlueScriptII KS(+) <i>hTPST2</i>	Dr. Lorenz Mayr (Novartis International AG, Basel, Schweiz)
pET-27b, pET-28a, pET-32a, pET-39b, pET-40b, pET-43b	Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach/Ts.)
pET-27b mod (ohne pel B <i>leader</i>)	Dr. Ralf Seidel (MPI, Dortmund)
pBlueBacHis2 A	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pPICZ α B	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pEGFP-N1	Clontech Laboratories GmbH (Heidelberg)

g) Bakterien-Stämme und Zell-Linien

<i>E. coli</i> DH5 α [™]	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene [®] Europe (Amsterdam, Die Niederlande)
<i>E. coli</i> XL10-Gold [®]	Stratagene [®] Europe (Amsterdam, Die Niederlande)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) CodonPlus RIL	Stratagene [®] Europe (Amsterdam, Die Niederlande)
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach/Ts.)
<i>E. coli</i> Origami [™] (DE3)	Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach/Ts.)
Insektenzellen Sf21	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
COS-7	ECACC (Großbritannien)

2.1.3 Nährmedien

Die Nährmedien wurden, falls erforderlich, 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hitzeinstabile Zusätze wurden sterilfiltriert ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) und dem abgekühlten Medium zugesetzt. Für Agarplatten wurden die Medien mit 1,5% Agar supplementiert.

a) Flüssigmedien

Luria-Bertani (LB) -Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, pH 7,0
----------------------------	---

SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 3,6 g Glucose, ad 1 l H ₂ O, pH 7,0
2×YT-Medium	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, pH 7,0
Insektenzell-Medium	TC 100-Medium (Invitrogen GmbH; Karlsruhe), 10% (v/v) FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch)
YPD-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Saccharose, ad 1 l H ₂ O
YPDS-Medium	YPD-Medium, 1 M Sorbitol
MD-Medium	13,4 g Hefe Nitrogen Base, 0,4 mg Biotin, 20 g Dextrose, ad 1 l H ₂ O
MM-Medium	13,4 g Hefe Nitrogen Base, 0,4 mg Biotin, 5 ml Methanol, ad 1 l H ₂ O
BMGY-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 13,4 g Hefe Nitrogen Base, 0,4 mg Biotin, 10 ml Glyzerin, ad 1 l H ₂ O
BMMY-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 13,4 g Hefe Nitrogen Base, 0,4 mg Biotin, 5 ml Methanol, ad 1 l H ₂ O
HUVEC-Zellkultur-Medium	Endothelzellmedium 10 M199 (Invitrogen GmbH; Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH; Umkirch), 15 mM HEPES Puffer pH 7,4, 1× Antibiotic-Antimycotic Lösung (Invitrogen GmbH; Karlsruhe), 1× Fungizon (2,5 µg/ml Amphotericin B; Invitrogen GmbH; Karlsruhe)
COS-7-Zellkultur-Medium	DMEM (4,5 g/l Glucose; PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 10% (v/v) FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch), 2 mM L-Glutamin

b) Antibiotika und IPTG

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Zeocin	25 – 100 µg/ml
IPTG	1 mM

2.2 Methoden**2.2.1 Molekularbiologische Methoden****2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach Mullis (Mullis und Faloona, 1987) in einem T3 Thermocycler (WHATMAN Biometra[®]; Göttingen). Der Reaktionsansatz setzte sich aus zehnfach Puffer, 5 pmol pro dNTP, je 10 pmol beider Primer, 0,5 U Polymerase und einer entsprechenden Menge Matrizen-DNA zusammen. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min bei 94 °C, schloss sich ein Zyklus aus Denaturierung der DNA (30 s, 94 °C), Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA (30 s, Primer-spezifische Temperatur) und Extension des zu synthetisierten Stranges (30 s, 72 °C) mit optimierter Zyklenzahl an. Nach abschließender Extensionsphase (5 min) wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung erfolgte nach Maniatis (Sambrook und Russell, 2001) in einer DNA Sub Cell[™] Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH; München). Die Trennung von DNA-Fragmenten wurde in 1%-igen Agarose-Gelen unter Zusatz von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei 12 V/cm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Gel Doc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

2.2.1.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem EasyPure DNA Purification Kit (Biozym Diagnostik GmbH; Hess. Oldendorf) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Die durchgeführten Restriktionsansätze enthielten folgende Komponenten: 1 µg DNA, 10 U einer bzw. zweier Restriktionsendonukleasen pro µg eingesetzter DNA und zehnfach Puffer. Die Ansätze wurden für einen analytischen Verdau 1 h und für einen quantitativen Verdau 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.2).

2.2.1.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye™ Terminator Kit (Applied Biosystems; Foster City, Californien, USA). 4 µl des Mixes wurden mit 500 nmol DNA und 10 pmol Primer gemischt. Mit dem Reaktionsansatz wurde folgender Sequenzierungszyklus durchgeführt: 15 s bei 94 °C für die Denaturierung der DNA, 30 s bei spezifischer Anlagerungstemperatur des verwendeten Primers und 4 min bei 60 °C für die Extension des zu synthetisierten Stranges für 25 Zyklen. Die Reaktionsprodukte wurden mit Ethanol unter Zugabe von 0,3 M Natriumacetat pH 4,6 und 0,2 mg/ml Dextran-Blau gefällt und einmal in Ethanol gewaschen. Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente erfolgte mittels 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, Californien, USA / Hitachi; San Jose, Californien, USA).

2.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Vorbereitung der Ligation wurden DNA-Fragmente und Vektoren mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.1.4) und gereinigt (2.2.1.2 und 2.2.1.3). Vektor und DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis 1 : 3 eingesetzt. Die Ligationsansätze (20 µl) enthielten 100 ng geschnittenen Vektor, entsprechende Mengen geschnittenes DNA-Fragment, 400 U T4 DNA Ligase (New England Biolabs GmbH; Frankfurt/M.) sowie zehnfach Puffer. Sie wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Ligationsprodukte in *E. coli*-Wirtszellen transformiert (2.2.3.1).

2.2.1.7 Einführung von Mutationen in doppelsträngige DNA

Zur Einführung von Mutationen in doppelsträngige DNA-Moleküle wurde der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene® Europe, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

2.2.1.8 Herstellung von His-Hirudin und Ligation in pET-28a

Zur Herstellung der genetischen Sequenz von Hirudin Variante 2 (HV2; Swiss-Prot-Eintrag P09945) wurden Primer aneinander gelagert. Je 5 µl Primer hirudinNde1s, hirudin1s, hirudin2s, hirudin3s, hirudin4s, hirudinXho1s (je 1 nmol/µl) für den „sense“ Strang und je 5 µl Primer hirudinNde1as, hirudin1as, hirudin2as, hirudin3as und hirudinXho1as (je 1 nmol/µl) für den „antisense“ Strang wurden gemischt. Damit eine Verbindung der einzelnen Oligomere erfolgt, mussten im ersten Schritt die 5'-Enden der Primer phosphoryliert werden. Dazu wurden 6 µl des „sense“-Mixes und 5 µl des „antisense“-Mixes mit je 20 pmol rATP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) und 1 U T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) pro nmol Primer zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Anlagerung der Primer wurden beide Phosphorylierungsansätze miteinander vereinigt, das Gemisch für 2 min auf 94 °C geheizt und innerhalb von 1,5 h auf 37 °C abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden sämtliche Oligos miteinander kovalent verbunden (Abschnitt 2.2.1.6). Gleichzeitig wurde das entstehende Fragment in den Vektor pET-28a (durch Restriktion mit Nde I und Xho I vorbereitet; Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) ligiert. Dazu wurden 495 fmol des Anlagerungsansatzes mit 30 fmol pET-28a Nde I/Xho I, 4 U T4-Ligase (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Niederlande) und 10 pmol rATP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) gemischt und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Die Plasmide wurden anschließend in *Escherichia coli* X11-Blue transformiert (2.2.3.1) und sequenziert (2.2.1.5). Die in dieser Arbeit verwendete HV2 Variante enthielt eine Mutation (N47K), die ansonsten bei HV1 auftritt.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) in einer Mighty Small II Elektrophoresekammer (Hoeffer/Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg). Als Molekulargewichtsmarker wurden Mark 12 bzw. SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Protein Standards (beide Invitrogen GmbH; Karlsruhe) verwendet. Die Darstellung der getrennten Proteine wurde durch Coomassie-Färbung (Frey und Radola, 1982) bzw. bei Proteinmengen <10 pmol pro Gelspur durch Silber-Färbung (Heukeshoven und Dernick, 1985) erreicht.

2.2.2.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE)

Die Durchführung der nativen-PAGE erfolgte modifiziert nach Laemmli für SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in einer Mighty Small II Elektrophoresekammer (Hoeffer/Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg). Trenngel und Sammelgel wurden aufgrund der theoretischen pIs von hTPSTATMD mit α -Peptid von 6,22 und von His-Hirudin von 5,64 mit 1,8 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) und ohne SDS hergestellt. Als Molekulargewichtsmarker wurde SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) verwendet. Die Darstellung der getrennten Proteine wurde durch Coomassie-Färbung (Frey *et al.*, 1982) erreicht. Radioaktive Proteinbanden wurden durch mehrtägige Exposition des getrockneten Polyacrylamid-Gels auf eine Imaging-Platte detektiert (GS-525 Molecular Imager[®] System; BIO-RAD Laboratories GmbH, München).

2.2.2.3 Trichloressigsäurefällung

Zur Konzentrierung einer Proteinlösung wurde diese im Volumenverhältnis 1 : 1 mit 72%-iger Trichloressigsäure (4 °C) gemischt und für 30 min bei -20 °C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (17500×g, 10 min, 4 °C) sedimentiert und zweimal mit 500 μ l Aceton (-20 °C) gewaschen. Das Proteinsediment wurde bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend in Probenpuffer gelöst und für die SDS-PAGE (2.2.2.1) verwendet.

2.2.2.4 Western-Blot

Die Durchführung des Western-Blots erfolgte im „*semi-dry*“-Verfahren nach Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984). Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf Immobilon™ PVDF Membran (Millipore GmbH, Eschborn; 75 min; 1,5 mA/cm²). Die Membran wurde vor Gebrauch in Methanol angefeuchtet. Als Transferpuffer wurde 25 mM Tris/Base (pH 8,3), 150 mM Glyzin, 10% Methanol verwendet. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran in 5% Milchpulver (w/v; Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell; in TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl)) für 1 h bei 37 °C blockiert. Die Membran wurde mit einem spezifischen primären Antikörper (gelöst in 3% Milchpulver in TBS) inkubiert anschließend zweimal 5 min mit TBS-T und einmal 5 min mit TBS gewaschen. Zur Detektion des primären Antikörpers dienten Peroxidase-konjugierte anti-Kaninchen IgG bzw. anti-Maus IgG (Verdünnung 1:1000 in TBS; 1 h, RT). Nach dreimaligem Waschen der PVDF-Membran mit TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit Chemilumineszenz-Lösung, die durch Mischen von 2,5 mM Luminol, 400 µM p-Cumarsäure, 1% (v/v) DMSO in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 und 5,4 mM H₂O₂ in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 hergestellt wurde. Die Detektion der Chemilumineszenz-Signale erfolgte auf FUJI Medical X-Ray Film (Fuji Photo Film Co., Ltd; Japan).

Um die gebundenen primären und sekundären Antikörper von der PVDF-Membran zu entfernen, wurde sie in 62,5 mM Tris/HCl Puffer (pH 6,7, 2% (w/v) SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol) 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrfach mit TBS-T gewaschen und konnte nach Blockieren der freien Bindungsstellen erneut für die Immundetektion eingesetzt werden.

2.2.2.5 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC)

Aus komplexen Proteingemischen wurden mittels der Ni-Chelat-Chromatografie (His•Bind™ Matrix; Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts., 1,6 × 15 cm Säulenvolumen, equilibriert mit 20 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl) Ni²⁺-komplexierende Proteine angereichert. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch 250 mM Imidazol (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl; Fraktionsgröße: 3 ml). Die Überprüfung der erhaltenen Fraktionen

erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels bzw. durch Western-Blot-Analyse.

2.2.2.6 Dialyse

Eine Dialyse wurde durchgeführt, um die Pufferlösung, in der sich ein Protein befand, auszutauschen. Dazu wurde die Proteinlösung in einen vorher im Puffer equilibrierten Dialyseschlauch (ZelluTrans, Molekulargewichts-Ausschluss: 4000-6000 Da; Roth, Karlsruhe) überführt. Die Dialyse erfolgte im 100-fachen Volumenüberschuss bei 4 °C über mehrere Stunden bis Tage. Die Pufferlösung wurde ggf. mehrfach gewechselt.

2.2.2.7 Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese

Die 2-D Gelelektrophorese folgte prinzipiell Methoden von O'Farrell in der ersten und Klose in der zweiten Dimension (O'Farrell, 1975; Klose, 1975) und wurde nach Angaben des Herstellers des Immobiline[®] Dry Strip Kit für 2-D Electrophoresis mit Immobiline[®] Dry Strip und ExcelGel[®] SDS (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) mit Hilfe eines Multiphor II Electrophoresis Systems (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) in der ersten Dimension und einer SDS-PAGE in der zweiten Dimension durchgeführt.

Für die isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension wurden Immobiline[™] Dry Strip (pH 3-10NL, 13 cm; Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) benutzt. Diese wurden über Nacht rehydriert. Die Probenpräparation erfolgte in 2-D Probenpuffer (8 M Harnstoff, 2% (w/v) β -Mercaptoethanol, 2% (v/v) Pharmalyte 3-10, 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) Bromphenolblau). Die Proben wurden auf die Gelstreifen aufgetragen und die isoelektrische Fokussierung nach folgendem Programm durchgeführt (Tab.2):

Tab.2. Programm für die isoelektrische Fokussierung der 2-D Gelelektrophorese mit einem Multiphor II Electrophoresis System.

Schritt	U [V]	I [mA]	P [W]	t [h]	W [kVh]
1	300	2	5	0:01	
2	3500	2	5	1:30	2,9
3	3500	2	5	4:00	14,1

Die Trennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse erfolgte in der zweiten Dimension mit einer Stromstärke von 4 mA pro cm SDS-Polyacrylamid-Gel bei 4 °C. Die Proteine wurden anschließend mittels Silber-Färbung nach Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 1996) sichtbar gemacht.

2.2.2.8 In-Gel Verdau und Identifizierung proteolytischer Peptide

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach Coomassie-Färbung (Frey *et al.*, 1982) bzw. nach Silber-Färbung nach Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 1996) für 2× 10 min in H₂O gespült. Gelstücke mit dem zu identifizierenden Protein wurden ausgeschnitten und mit Acetonitril (10 min) geschrumpft. Nach Abnahme des Acetonitrils wurde das Gelstück mit 0,1 M (NH₄)₂CO₃ rehydriert (5 min). Durch Zugabe des gleichen Volumens Acetonitril wurde das Gel abermals geschrumpft (15 min). Im Anschluss daran wurde das Gelstück in einer Speed Vac SC110 (ThermoSavant; Holbrook, New York, USA) 30 min getrocknet. Um Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde das getrocknete Gel in 10 mM DTT in 0,1 M (NH₄)₂CO₃ bei 56 °C für 45 min aufgeschwemmt. Es folgte ein wiederholtes Einschrumpfen des Geles mit Acetonitril (5 min). Der Überstand wurde entfernt und das Gel in 55 mM Jodacetamid-Lösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und das Gel mit 0,1 M (NH₄)₂CO₃ gewaschen (5 min) und mit dem gleichen Volumen Acetonitril geschrumpft (5 min). Der Überstand wurde entfernt und das Gelstück in der Speed Vac SC110 (ThermoSavant; Holbrook, New York, USA) getrocknet (30 min). Der tryptische Verdau der im Gel befindlichen Proteine erfolgte durch Inkubation für 45 min bei 0 °C in 0,05 M (NH₄)₂CO₃, 5 mM CaCl₂ und 0,0125 mg/ml Trypsin (0,025 mg gelöst in 10 µl 1 mM HCl). Der Überstand wurde entfernt und das Gelstück im gleichen Puffer ohne Trypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Gelstücke sedimentiert (13800×g) und der Überstand in MALDI-Massenspektrometrie eingesetzt.

Hierfür wurde 1 µl des peptidhaltigen Überstandes mit 1 µl gesättigter α-cyano-4-hydroxymethylsäure (in 0,1% TFA/Acetonitril 2:1) gemischt und auf eine MALDI-Platte aufgetragen und getrocknet. Das Gemisch wurde anschließend mit 2 µl 0,1% (v/v) TFA gewaschen.

Die MALDI-Massenspektrometrie wurde an einem Voyager-DE™ Pro Gerät (PerSeptive Biosystems; Applied Biosystems; Foster City, Californien, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Data Explorer (Applied Biosystems; Foster City, Californien, USA).

2.2.2.9 TPST-Enzymaktivitätsassay

Der Enzymaktivitätstest beruht auf einer Methode von Ramaprasad und Kasinathan (Kasinathan *et al.*, 1998), bei der Proteine von nicht umgesetztem [³⁵S]-PAPS getrennt und radioaktiv markierte, sulfatierte Proteine mittels Flüssigscintillationsmessung nachgewiesen werden. Diese Methode gibt Aufschluss darüber, ob ein in der Probe befindliches Protein den Transfer der Sulfurylgruppe von [³⁵S]-PAPS auf ein geeignetes Substratprotein katalysiert. Als Substrat-Protein wurde His-Hirudin eingesetzt, das an Tyr63 sulfatiert wird (Niehrs *et al.*, 1990b).

Zur Messung der TPST-Aktivität wurde folgender Standardansatz verwendet:

20 mM MES Puffer pH 6,5
20 mM MnCl₂
50 mM NaF
0,4 mM Hirudin
1 µCi [³⁵S]-PAPS (0,45 mM)

40 µl des Standardansatzes wurden mit 10 µl Probe gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. 40 µl dieses Reaktionsansatzes wurden anschließend auf Nitrozellulose (NC45, 0,45 µm, Ø25 mm; Schleicher & Schuell, Dassel) getropft und getrocknet. Die Nitrozellulosefilter mit den darauf gebundenen Proteinen wurden 2× 10 min, RT in kalter 10%-iger Trichloressigsäure gewaschen und danach erneut getrocknet. Die auf die Proteine übertragene ³⁵S-Radioaktivität wurde durch Flüssigscintillationsmessung im LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim) bestimmt.

2.2.3 Bakterien- und Zellkultur

2.2.3.1 *E. coli*-Stämme in Kultur

Die Bakterienstämme wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten angezogen. Antibiotika wurden falls erforderlich zugegeben.

2.2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Schüttelkultur des entsprechenden Bakterienstammes in LB-Medium (50 ml; 37 °C) wurde in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (3000×g). Die Zellen wurden in einem halben Volumen 0,1 M CaCl₂-Lösung (sterilfiltriert, 0 °C) resuspendiert und 30 min bei 0 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000×g) wurde das Zellpellet in ¹/₁₀ Volumen 0,1 M CaCl₂-Lösung (sterilfiltriert, 0 °C) und 15% Glycerin aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wurde aliquotiert (100 µl) und bei –80 °C gelagert.

2.2.3.3 Herstellung von *E. coli*-Glyzerinkulturen

Zur Herstellung einer Glyzerinkultur wurden 700 µl einer logarithmisch wachsenden Schüttelkultur mit 300 µl 80%-er Glyzerinlösung (steril) gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei –80 °C gelagert.

2.2.3.4 *Spodoptera frugiperda* (Sf21) -Zellen in Kultur

Die Insektenzellen Sf21 wurden bei 27 °C in TC 100-Medium (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) und 10% FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch) kultiviert. Wenn die Zellen in Zellkulturschalen (Falcon[®]; Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France) angezogen wurden, erfolgte bei 90% Konfluenz eine Aufteilung der Zellen im Verhältnis 1:5. Erfolgte die Zellanzucht im 1,8 l Fernbach-Kolben (max. 300 ml), wurde 0,1% Pluronic[®] (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) zum Medium zugegeben.

2.2.3.5 Herstellung von Sf21-Glyzerinkulturen

Konfluente Sf21-Zellen wurden mit TC 100-Medium (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) und 10% FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch) von ihrer Oberfläche durch Abspülen gelöst und bei 500×g (10 min, RT) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 60% Grace's Medium (Invitrogen GmbH; Karlsruhe), 30% FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch) und 10% DMSO (Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg) in einer Zelldichte von 1·10⁷ Zellen/ml resuspendiert und in eisgekühlte Kryo-Gefäße aliquotiert (1 ml). Es folgte ein langsames Abkühlen der Zellen (-20 °C für 1 h, danach -80 °C für 2 d), bis sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

2.2.3.6 *Pichia pastoris* X-33-Zellen in Kultur

Die Hefezellen *P. pastoris* X-33 benötigen YPD-Medium für das Wachstum. Wurden Agarplatten verwendet, so war dem Medium 25 – 100 µg Zeocin (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) zugesetzt.

2.2.3.7 Herstellung kompetenter *P. pastoris* X-33-Zellen

Die Herstellung kompetenter *P. pastoris* X-33-Zellen erfolgte nach Anleitung von Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

2.2.3.8 Herstellung von *P. pastoris* X-33-Glyzerinkulturen

Die Herstellung von *P. pastoris* X-33-Glyzerinkulturen erfolgte nach Anleitung von Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

2.2.3.9 Bestimmung des Mut-Phänotypes von *P. pastoris* X-33-Zellen

Zur Bestimmung des Mut-Phänotypes von *P. pastoris* X-33-Zellen wurden einzelne X-33-Kolonien auf MM- und MD-Agarplatten überführt und für 2 d bei 30 °C inkubiert (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

2.2.3.10 Isolierung und Kultivierung venöser Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden nach einer modifizierten Methode von Jaffe isoliert (Jaffe *et al.*, 1973).

Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer (1× Antibiotic-Antimycotic Lösung und 1× Fungizon (2,5 µg/ml Amphotericin B) in Dulbeccos *phosphate-buffered saline* I (alles Invitrogen GmbH, Karlsruhe)) überführt und bei 4 °C gelagert. Im weiteren erfolgte die Isolierung der Endothelzellen unter sterilen Bedingungen bei RT. In die Vene der Nabelschnur wurde von beiden Seiten eine Knopfkanüle mit Schlauchansatz eingeführt und befestigt. Durch diesen Zugang wurde die Vene zuerst mit HBSS (*Hanks balanced salt solution*; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gespült und anschließend mit Collagenase-Lösung (Dulbeccos *phosphate-buffered saline* II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 0,05% Collagenase IV (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) gefüllt. Die Gefäßenden der Vene wurden verschlossen und die

Nabelschnur für 11 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit Endothelzellmedium 10 (M199 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 10% FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch), 15 mM HEPES pH 7,4, 1× Antibiotic-Antimycotic Lösung und 1× Fungizon (2,5 µg/ml Amphotericin B) (beide Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aus der Vene gespült und durch Zentrifugation (250×g, 6 min, RT) geerntet. Das Zellpellet wurde in 5 ml Endothelzellmedium 10 resuspendiert. Endothelzellen aus mehreren Nabelschnüren wurden vereinigt, gemischt und auf einzelne mit Gelatine vorbehandelte Zellkulturgefäße (1% Gelatine für 1 h bei 37 °C und in 5% CO₂ inkubieren) verteilt. Im Anschluss an eine 1,5 stündige Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde das Medium durch frisches Endothelzellmedium 10 mit 1% Endothelzellwachstumsfaktor (M199 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 8,3% FCS (Cell Concepts GmbH; Umkirch), 1,67 mg/ml *Endothel cell growth supplement* (cc pro; Neustadt) und 1250 U/ml Heparin, sterilfiltriert) ersetzt und bei 37 °C und 5% CO₂ weiter inkubiert, wobei das Medium alle 48 h erneuert wurde.

2.2.3.11 COS-7-Zellen in Kultur

COS-7-Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden sie einmal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA Lösung (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst. 1×10^6 Zellen wurden in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche (Falcon®; Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) überführt und erneut inkubiert.

2.2.4 Arbeiten mit *E. coli*-Zellen

2.2.3.1 Transformation eines Plasmid-Vektors in *E. coli*-Wirtszellen

Kompetente *E. coli*-Zellen (100 µl, 2.2.3.2) wurden mit 20 – 200 ng des entsprechenden Vektors gemischt und 1 h bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) unterzogen und 30 s bei 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurde die Zellkultur 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Wirtszellen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Wirtszellen erfolgte aus 3 – 10 ml einer Übernachtskultur mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits bzw. aus 100 ml einer Übernachtskultur mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit bzw. dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers (QIAGEN GmbH; Hilden).

2.2.4.3 *E. coli*-Expressionskulturen

Zur Expression von heterologen Proteinen in *E. coli* wurden die Wirtsstämme BL21(DE3) CodonPlus RIL (Stratagene® Europe; Amsterdam, The Netherlands), BL21 pBD540+542, Rosetta (DE3) pLysS oder Origami™(DE3) (beide Calbiochem-Novabiochem GmbH; Schwalbach/Ts.) verwendet. Aus einer Übernachtskultur (37 °C, mit Antibiotikum) wurde eine Hauptkultur 1:50 angeimpft und bei gewünschter Temperatur (16 – 37 °C) unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (sterilfiltriert) in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen. Nach 2 – 5 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (3000×g) und in einem geeigneten Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1500×g) wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4 Bakterien-Aufschluss

Das Bakterien-Pellet wurde in 10 – 40 ml Puffer suspendiert. Zur Hemmung von Proteasen wurde PMSF (1 mM) und, falls erforderlich, Complete® EDTA-frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch dreimalige Passage der Zell-Suspension durch einen Microfluidizer (120 psi; Microfluidics Corp.; Newton, Massachusetts, USA) und wurde im Anschluss mikroskopisch überprüft. Zelltrümmer und Membranbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation (1 h, 100000×g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde für die weitere Reinigung verwendet.

2.2.4.5 Reinigung von Einschlusskörpern (Inclusion Bodies)

Das Bakterien-Pellet (ca. 15 g) wurde in 40 ml 0,1 M Tris/HCl Puffer (pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; 4 °C) mit Hilfe eines Ultra Turrax Polytron® (Kinematica; Kriens-

Luzern, Schweiz) suspendiert. Durch dreimalige Passage der Bakterien-Suspension durch einen Microfluidizer (120 psi; Microfluidics Corp.; Newton, Massachusetts, USA) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 U DNaseI (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) und 3 mM MgCl₂ und anschließender Inkubation für 30 min bei RT verdaut. Zur Auflösung von Membranbestandteilen, wurden 0,5 Volumen einer Lösung bestehend aus 60 mM EDTA, 6% Triton X-100 und 1,5 mM NaCl (pH 7,0) zugegeben und die Mischung für 30 min bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die erhaltenen Inclusion Bodies wurden durch Zentrifugation sedimentiert (48000×g, 15 min, 4 °C) und fünfmal mit 0,1 M Tris/HCl Puffer (pH 7,0, 20 mM EDTA) gewaschen.

2.2.4.6 Denaturierung und Rückfaltung von Proteinen aus Inclusion Bodies

Gewaschene und sedimentierte Inclusion Bodies wurden in 1 ml Denaturierungspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 300 mM DTT, 1 mM EDTA) suspendiert und die darin enthaltenen Proteine über Nacht bei 10 °C vollständig entfaltet. Die Protein-Lösung wurde durch Zentrifugation (48000×g, 15 min, 4 °C) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und mit dem Denaturierungspuffer auf eine Konzentration von 5 mg/ml Protein eingestellt. Zur Rückfaltung der Proteine wurde die schnelle Verdünnungsmethode angewandt. Dazu wurde die Proteinlösung 1:100 im entsprechenden Rückfaltepuffer schlagartig verdünnt und anschließend 6 h bei 10 °C inkubiert. Um Proteinaggregate abzutrennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 200000×g (30 min, 4 °C). Die erhaltene Proteinlösung wurde im weiteren Verlauf analysiert.

2.2.5 Arbeiten mit Sf21-Zellen

2.2.5.1 Transfektion von Sf21-Zellen

Die Transfektion von Sf21-Zellen zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren erfolgte nach dem Protokoll des Bac-N-Blue™ Transfection Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Dabei wird linearisierte Wildtyp Baculovirus-DNA von *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (Bac-N-Blue™) mit pBlue-Bac-His2A hTPST1ΔTMD Vektor in Sf21-Zellen kotransfiziert. Während der Transfektion erfolgt durch homologe Rekombination zwischen dem Transfervektor und der Wildtyp Virus-

DNA ein Austausch des Polyhedrin-Genes des Virus gegen die rekombinante DNA-Sequenz des Transfervektors. Die Rekombination von Teilen des *lacZ*-Gens führt gleichzeitig zur möglichen Blau/Weiss-Selektion rekombinanter Viren, die *hTPST1ΔTMD* unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors inseriert haben.

Für die Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen (2×10^6) in Sf-900II Medium (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) in 60 mm Zellkulturschalen (Falcon®; Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France) ausgesät und für 1 h bei 27 °C inkubiert. Ein Aliquot Bac-N-Blue-DNA, 4 µl pBlue-Bac-His 2A *hTPST1ΔTMD* (1 µg/µl), 1 ml Sf-900II Medium und 20 µl Cellfectin wurden gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Die Sf21-Zellen in den Zellkulturschalen wurden mit zwei ml Sf-900II Medium gewaschen und danach mit dem Transfektions-Mix bedeckt. Die Transfektion erfolgte für 5 h bei 27 °C. Anschließend wurde 1 ml TC 100-Medium mit 10% FCS zugegeben und die Zellen für 7 Tage bei 27 °C inkubiert. Aus dem Überstand wurden im Anschluß daran rekombinante Viren gereinigt.

2.2.5.2 Isolierung rekombinanter Viren im „Plaque-Test“

Der „Plaque-Test“ wurde zur Isolierung rekombinanter Baculoviren durchgeführt. Es wurde nach Anleitung des Bac-N-Blue™ Transfection Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gearbeitet.

2.2.5.3 Vermehrung rekombinanter Viren

In der Agarose fixierte rekombinante Baculoviren sollten isoliert und vermehrt werden. Dazu wurden 5×10^5 logarithmisch wachsende Sf21-Zellen in jede Vertiefung einer 12-Loch Zellkulturplatte ausgesät (in 3 ml). Aus den Platten des Plaque-Tests wurden Agarosestücke, die rekombinante Viren enthielten, gestanzt und zu den Zellen in der Zellkulturplatte gegeben. Nach 3 Tagen Inkubation bei 27 °C wurden die angehefteten Zellen vorsichtig vom Untergrund abgelöst. 0,75 ml des Virus enthaltenden Mediums wurde entfernt und durch frisches Medium (TC 100/10% FCS) ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand als Virusstammlösung (P1) abgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.2.5.4 Identifizierung rekombinanter Baculoviren mittels PCR

Im ersten Schritt wurde aus dem nach 3 Tagen abgenommenen Überstand (2.2.5.3) die Viren-DNA isoliert. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 5000×g, RT) zur Entfernung von Zelldebris, wurde der Überstand zur Konzentrierung der Viren mit 0,75 ml kaltem (4 °C) 20%-igen Polyethylenglycol 8000 in 1 M NaCl vermischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Viren wurden durch Zentrifugation (13800×g, 10 min, RT) pelletiert und anschließend in 100 ml sterilem H₂O resuspendiert. Durch die Zugabe von 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) und Inkubation bei 50 °C für 1 h wurden die Viruspartikel aufgebrochen. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Phenol-Chloroform Extraktion (1:1) und durch eine sich anschließende Ethanolpräzipitation (Zugabe von ¹/₁₀ Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,6 und 2,5 Volumen Ethanol, 16 h, -20 °C). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O aufgenommen und konnte für die PCR als Matrizen-DNA eingesetzt werden.

Die PCR-Ansätze enthielten: zehnfach PCR-Puffer, je 0,2 mM pro dNTP, je 0,4 mM „sense“ bzw. „antisense“ Primer (Baculovirusforward bzw. Baculovirusreverse und TPST1-kurz bzw. TPST1-kurz), 2 U *Taq* DNA Polymerase (Eppendorf AG, Hamburg) und 1:125 Matrizen-DNA aus der Viruslösung. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 30 s wurden 25 Zyklen mit folgendem Programm durchgeführt: 95 °C 30 s, 46 °C 30 s und 72 °C 1 min. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.5.5 Herstellen einer Virusstammlösung mit hohem Titer

Für die Infektion grosser Zellzahlen wurde eine Virusstammlösung mit hohem Titer benötigt. Dazu wurden Sf21-Zellen in 1,8 l Fernbachkolben angezogen. Bei einer Zelldichte von $8 - 9 \times 10^5$ logarithmisch wachsender Zellen/ml wurden die Zellen mit rekombinanten Baculoviren (1 ml P1; 2.2.5.3) infiziert und 6 d bei 27 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der vollständigen Lysis der Zellen, wurde der Virus durch Zentrifugation (1000×g, 20 min, RT) geerntet und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert. Der Titer der Viruslösung konnte mit Hilfe der Endpunktverdünnung (2.2.5.6) bestimmt werden.

2.2.5.6 Titerbestimmung von Viruslösungen mittels Endpunktverdünnung

Zur Bestimmung des Titers der Virusstammlösung wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe (bis 10^{-8}) der Viruslösung in TC 100-Medium/10% FCS hergestellt. Je 100 μ l wurden mit 900 μ l logarithmisch wachsender Sf21-Zellen (2×10^5 Zellen/ml, mit 150 μ g/ml X-Gal) gemischt und in 100 μ l Aliquots in eine 96-Loch Platte überführt. Die Zellkulturplatte wurde mit Parafilm abgedichtet und 10 Tage bei 27 °C inkubiert. Der Virustiter konnte anhand der Anzahl der sich blau verfärbten Aliquots pro Virusverdünnung nach Reed und Munch (Summers und Smith, 1987) bestimmt werden.

2.2.5.7 Expression von *hTPST1ΔTMD* in Sf21-Zellen

Die Expression rekombinanten *hTPST1ΔTMD*s erfolgte in 1,8 l Fernbachkolben. Logarithmisch wachsende Sf21-Zellen (300 ml, $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden mit einer m.o.i („multiplicity of infection“) 10 mit rekombinanten Baculoviren, die das für *hTPST1ΔTMD* codierende Gen in ihrem Genom enthalten, infiziert. Die dafür benötigte Viruslösung berechnet sich folgendermaßen: ml Viruslösung = m.o.i [„Plaque forming unit“/Zelle] \cdot Zellzahl / Virustiter [„Plaque forming unit“/ml]). Die infizierten Zellen wurden bei 27 °C unter Schütteln inkubiert. Alle 12 h wurde 1 ml Zellsuspension als Probe genommen und anschließend im Western-Blot auf die Expression von *hTPST1ΔTMD*-His₆ untersucht (2.2.2.4).

2.2.6 Arbeiten mit *P. pastoris* X-33-Zellen

2.2.6.1 Transformation eines Plasmid-Vektors in *P. pastoris* X-33

Im ersten Schritt wurde der zu transformierende Vektor linearisiert. Dazu wurden 5 – 10 μ g Plasmid DNA mit 20 U Pme I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M.) linearisiert (4 h, 37 °C). Zu dem Reaktionsansatz wurden $1/10$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 2,5 Volumen Ethanol gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20 °C (16 h). Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (17530 \times g, 30 min, 4 °C) pelletiert und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde bei 37 °C getrocknet und in 10 μ l H₂O gelöst.

Die DNA-Lösung wurde mit 80 μ l kompetenter X-33-Zellsuspension (2.2.3.7) gemischt und in einer Elektroporationsküvette (1 mm; Biozym Diagnostik GmbH, Hess.

Oldendorf) 5 min bei 0 °C inkubiert. Die Transformation wurde mit einem Electroporator (GenePulser; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 1500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F durchgeführt. Die Zellen wurden sofort in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, in ein Zellkulturrohrchen überführt und 2 h bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension auf YPDS-Agarplatten, die 100 μ g/ml Zeocin (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) enthielten, plattiert und für 3 d bei 30 °C inkubiert.

2.2.6.2 Analyse der X-33-Transformanten

Die nach einer Transformation erhaltenen X-33-Zellen wurden zur Überprüfung des ins Genom integrierten DNA-Fragmentes einer Kontroll-PCR unterzogen. Dazu wurden 12 Klone in je 10 μ l H₂O überführt und mit 5 μ l Lyticase (5 U/ μ l; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) versetzt. Die Zellsuspensionen wurden zuerst für 10 min bei 30 °C und anschließend für 30 min bei -80 °C inkubiert. Das daraus resultierende Zelllysate wurde direkt als Probenmaterial in den Kontroll-PCR-Ansätzen eingesetzt: zehnfach PCR-Puffer mit 5 mM MgCl₂ im Reaktionsansatz, 0,2 mM pro dNTP, je 0,2 mM TPST1-kurz bzw. TPST2-kurz „sense“- und „antisense“- Primer, 2 U *Taq* DNA Polymerase (Eppendorf AG, Hamburg) und eine geeignete Menge Probenmaterial (z.B. 1 μ l bei 25 μ l PCR Ansätzen). In Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer wurde folgendes Programm durchlaufen: 95 °C 90 s Initiation, anschließend 36 Zyklen 95 °C 30 s, 58 °C 30 s und 72 °C 30 s. Die Analyse der PCR-Ansätze erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.3).

2.2.6.3 Expression von *hTPST Δ TMD* in X-33 nach Mut⁺-Phänotyp

Eine *P. pastoris* X-33-Kolonie mit ins Genom integriertem pPICZ α B *hTPST Δ TMD* wurde in 25 ml BMGY-Medium überführt und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 2 - 6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (1500 \times g, RT) und in BMMY-Medium bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 1 resuspendiert. Die Zellen wurden für die Expression bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Expression von *hTPST Δ TMD* wurde durch Methanol induziert (Zugabe von 0,5% (v/v) Methanol aller 24 h, sterilfiltriert).

Nach 6 d wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500×g, RT) pelletiert und Medium sowie Zellpellet bei -80 °C gelagert.

2.2.6.4 Expression von *hTPSTΔTMD* in X-33 nach Mut^s-Phänotyp

Mit einer Einzelkolonie *P. pastoris* X-33 pPICZαB *hTPSTΔTMD* wurden 100 ml BMGY-Medium inokuliert und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 2 – 6 unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (1500×g, RT) und in 1/6 des Ausgangsvolumen in BMMY-Medium resuspendiert. Für die Expression wurden die Zellen weiterhin bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und alle 24 h mit 0,5% Methanol (sterilfiltriert) induziert. Nach 6 d wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500×g, RT) geerntet. Zellpellet und Medium wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.6.5 Aufschluss von *P. pastoris* X-33-Zellen

P. pastoris X-33-Zellen wurden in Breaking-Puffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerol, 1 mM PMSF frisch zugesetzt) und, falls erforderlich, unter Zugabe von Complete[®] EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) resuspendiert. Die Zellen wurden konstant bei 0 °C temperiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen säure-gewaschene Glaskügelchen (425-600 Micron; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zugegeben. Die Zellen wurden durch achtmaliges vortexen (30 s) und anschließende Inkubation bei 0 °C (30 s) aufgeschlossen. Zelltrümmer und Glaskügelchen wurden durch Zentrifugation (20 min, 14000×g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde mittels IMAC (2.2.2.5) weiter aufgereinigt.

2.2.7 Arbeiten mit HUVEC

2.2.7.1 Applikation von laminarer Schubspannung

Zur Untersuchung der Effekte von laminarer Schubspannung auf HUVEC wurde ein nach Sdougos (Sdougos *et al.*, 1984) modifiziertes Plattenkegel-Viskosimeter verwendet (Abb. 2.1).

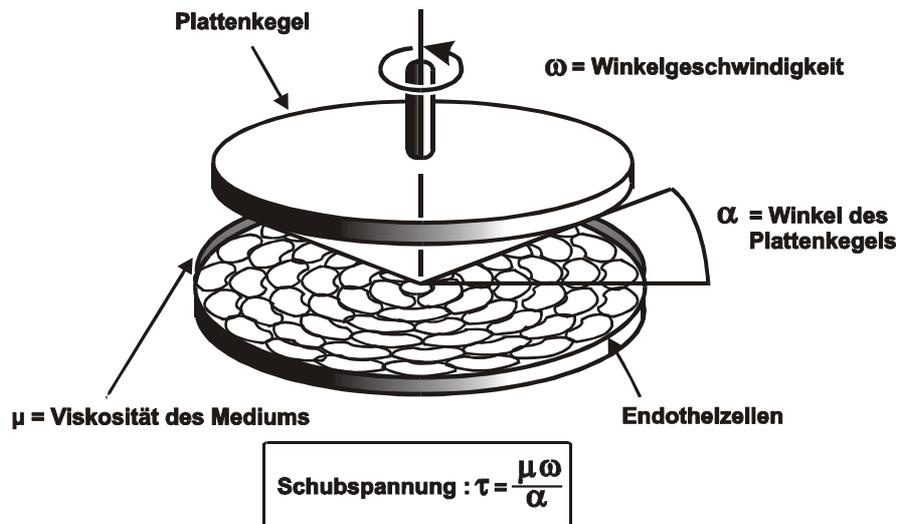


Abb.2.1 Schematische Darstellung des Plattenkegel-Viskosimeters. Die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen wird durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$ vermittelt. Die Schubspannung ist außerdem von der Viskosität des Mediums und der Winkelgeschwindigkeit abhängig. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von R. Busath, Institut für Pathophysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt.)

Über der Zellkulturschalenhalterung ist ein drehbarer Plattenkegel installiert, der mit einer stufenlos einstellbaren Drehgeschwindigkeit die Schubspannung auf die Endothelzellen überträgt.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen mit frischem Endothelzellmedium 10 ohne (bei Schubspannung von 1 bis 10 dyn/cm^2 , d. h. 0,1 bis 1 N/m^2) bzw. mit 5% Dextran (bei Schubspannung von 15 bis 30 dyn/cm^2 , d.h. 1,5 bis 5 N/m^2) für 1 h inkubiert und anschließend in die Plattenkegel-Apparatur eingesetzt. Der Kegel wurde über die Zellen abgesenkt und die spezifische Schubspannung am Potentiometer der Steuerung durch Einstellung der entsprechenden Winkelgeschwindigkeit ausgewählt. Die Schubspannung ist neben der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel α von $0,5^\circ$ des Plattenkegels von der Viskosität des Mediums abhängig. Die Zugabe von Dextran (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) erhöht die Viskosität des Endothelzellmediums 2,95-fach von 0,007 $\text{dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ auf 0,02065 $\text{dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ und vermeidet dadurch einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte. Zu jeder Probe wurde eine zeitgleiche interne stationäre Kontrolle mit gleichen Medium (mit bzw. ohne Dextran) mitgeführt.

Bei Untersuchungen zum Einfluss von Inhibitoren der Signalkaskaden wurden die entsprechenden Substanzen 1 h vor Start der Schubspannungs-Applikation dem Medium zugesetzt. Als Inhibitor von Protein Kinase C wurde 1 μ M RO-31-8220 verwendet, zur Inhibition von Tyrosin Kinasen wurde 1 μ M Herbimycin A eingesetzt.

2.2.7.2 mRNA-Isolierung aus HUVEC und Reverse Transkription

Nach der Applikation von Schubspannung auf HUVEC wurde die Gesamt-RNA aus den Endothelzellen durch Guanidinium-Isothiocyant/Cäsiumchlorid-Zentrifugation nach Chirgwin isoliert (Chirgwin *et al.*, 1979). 250 ng RNA wurde unter Einsatz von „random“-Hexamer Primern und SuperScriptII RNase H-Reverse Transcriptase (200 U/ μ l; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) revers transkribiert. Die Reaktion erfolgte bei 42 °C für 1 h.

2.2.7.3 Protein-Isolierung aus HUVEC

Zur Durchführung von Western-Blot-Analysen wurden aus den HUVEC nach Applikation von Schubspannung Gesamt-Zellysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit Dulbeccos „phosphate-buffered saline“ I (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen, in Lysis-Puffer (10 nM Tris/HCl pH 7,4, 2% SDS, Complete[®] EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)) aufgenommen und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation (5000 \times g, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Das Lysat wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, Il., USA) bestimmt.

2.2.8 Arbeiten mit COS-7-Zellen

2.2.8.1 Transfektion von COS-7-Zellen zur Expression von *h*TPST1-GFP

Für diesen Versuch wurden COS-7-Zellen auf sterilen Glasplättchen kultiviert, die vorher mit Poly-Lysin beschichtet worden waren (0,1% Poly-Lysin, 10 min, RT). 3×10^5 Zellen wurden auf die beschichteten Glasplättchen, die in den Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkulturplatte lagen, gegeben. Um mit GFP markiertes *h*TPST1 in COS-7-Zellen zu exprimieren, wurde 3 μ g EndoFree[®] gereinigte pEGFP-N1 *h*TPST1 Plasmid-DNA mit 15 μ l Superfect (Lipofectin, 3 mg/ml; QIAGEN GmbH, Hilden) gemischt. Als Kontrolle

wurde der gleiche Versuch mit pEGFP-N1 parallel durchgeführt. Nach Zugabe von 600 μ l COS-7-Medium (2.1.3) zu den Zellen in den Zellkulturplatten wurden die Plasmid-Superfect-Mixe ebenfalls in die Vertiefungen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation der Platten (37 °C, 5% CO₂) wurde das Medium erneuert. Zur Expression von *hTPST1*-GFP und GFP inkubierten die Zellen bei 37 °C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre für 27 h.

2.2.8.2 Färbung von Zellkern und Golgi in COS-7-Zellen

Um die Lokalisation von grün-fluoreszierenden Proteinen besser bestimmen zu können, wurden die Zellen 27 h post-Transfektion (2.2.8.1) doppelt angefärbt. Dazu wurden die Glasplättchen 1 \times mit PBS pH 7,4 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) gespült und die Zellen mit je 200 μ l 3% Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 fixiert (10 min, RT). Zum Blockieren wurde die Fixierlösung gegen 500 μ l einer Lösung bestehend aus 0,2% Gelatine und 0,5% BSA-Fraktion V in PBS pH 7,4 ausgetauscht und für 20 min bei RT inkubiert. Zur Färbung von Golgi-Proteinen wurde anti-Golgin97-Antikörper (1:250; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) verwendet. Die Gebrauchslösung wurde nach Anleitung des Herstellers hergestellt und zu je 200 μ l auf die Glasplättchen gegeben. Nach einer Inkubation der Zellen für 1 h bei RT wurden diese dreimal für 5 min unter leichtem Schütteln (110 rpm) mit PBS pH 7,4 gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3-konjugierte anti-Maus-IgG-Fraktion (H+L, aus Esel; Dianova GmbH, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS pH 7,4 (5 min, RT, leichtes Schütteln bei 110 rpm) entfernt. Zur Färbung des Zellkerns wurde DAPI (0,25 μ g/ml Gebrauchslösung; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) verwendet. Auf die gewaschenen Zellen wurde je 200 μ l DAPI Gebrauchslösung gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS pH 7,4 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) gewaschen. Die Glasplättchen wurden anschließend auf Objektträgern mit Gel/Mount[™] (Biomedica Corp., Foster City, CA, USA) eingebettet und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Axiophot Mikroskop und einer AxioCam Kamera durchgeführt (Axiovision 2.0 Software; Zeiss, Jena).

3 Ergebnisse

Über Proteine, die an Tyrosyl-Resten sulfatiert sind, ist bisher wenig bekannt. Noch weniger weiß man über die Proteine, die die Sulfatierungs-Reaktion katalysieren, die Tyrosylprotein Sulfotransferasen. Die offenen Fragestellungen beziehen sich auf eine mögliche Regulation der *h*TPST-Isoform-Expression, auf die Substratspezifitäten der Isoformen, ihre exakte Lokalisation und ihre Struktur. In dieser Arbeit wurde deshalb die Regulation der Expression der humanen TPST-Vertreter auf einen spezifischen, physisch entscheidenden Stimulus (Schubspannung) hin untersucht. Außerdem wurde versucht, mögliche isoform-spezifische Substrate zu isolieren. Weiterhin sollte die intrazelluläre Lokalisation der TPSTs abschließend geklärt werden. Um mit den TPSTs weiterführende *in vitro*-Studien durchführen zu können und im Hinblick auf die Strukturaufklärung der Proteine, sollten beide Isoformen löslich und aktiv exprimiert werden.

Als vorbereitende Arbeiten wurde rekombinantes His-Hirudin, das als Sulfuryl-Akzeptor im TPST-Sulfatierungsassay eingesetzt wurde, hergestellt. Ein anti-*h*TPST1 Δ TMD-Antikörper, zur Detektion von *h*TPST1 und *h*TPST1 ohne zytosolische und Transmembrandomäne (*h*TPST1 Δ TMD), wurde generiert.

3.1 Herstellung und Reinigung von rekombinantem His-Hirudin

Hirudin ist ein natürliches Substrat der *h*TPSTs und sollte deshalb rekombinant hergestellt und anschließend als Sulfuryl-Akzeptor im TPST-Enzymaktivitätsassay eingesetzt werden. Dazu wurde die DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Hirudin Variante 2 (HV2, Swiss-Prot-Eintrag P09945) durch Primer-Anlagerung (2.2.1.8) hergestellt. Bei dieser Technik wurden mehrere kleinere DNA-Fragmente (Primer) miteinander ligiert, sodass die genetische Sequenz von HV2 entstand. Dieses größere, für HV2 kodierende Fragment wurde anschließend in pET-28a kloniert. Nach Sequenzierung des entstandenen Konstruktes wurde festgestellt, dass die erhaltene DNA-Sequenz für HV2-Protein kodiert, allerdings eine für HV1 typische N47K Mutation auf Proteinebene enthält. Diese Mutation hat keinen Einfluss auf die Faltung, die Stabilität und die Sulfatierung von Hirudin an Tyr63 durch die TPSTs. Das entstandene Konstrukt trug aufgrund des gewählten Vektors pET-28a am N-Terminus des exprimierten Proteines ein His-Tag (His-Hirudin).

Die Expression von His-Hirudin erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bei 30 °C für 3 h. Die Zellen (ca. 2,6 g pro Liter Expressionskultur) wurden mechanisch (Microfluidizer) in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl aufgeschlossen.

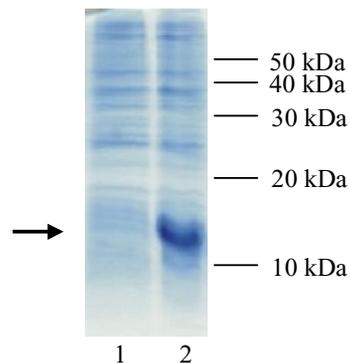


Abb.3.1 SDS-PAGE-Analyse der Expression von His-Hirudin in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Gesamtzelllysate wurden im 17,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Coomassie (blau). Der Pfeil markiert die erwartete Laufhöhe für His-Hirudin. (1, vor Induktion der Expression; 2, nach 3 h Expression)

Abb.3.1 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse einer His-Hirudin-Expressionskultur. Das theoretische Molekulargewicht von His-Hirudin beträgt 9208 Da. Das exprimierte Protein konnte im Molekulargewichtsbereich von ca. 13 kDa detektiert werden. Diese Abweichung im apparenten Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamid-Gel ist ein bekannter Effekt von Hirudin, der wahrscheinlich auf seine Besonderheit in Bezug auf Ladung und Struktur innerhalb des Proteins zurückgeht. Es ist demnach gelungen, His-Hirudin in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen zu exprimieren.

Nach dem Zellaufschluss und einer sich anschließenden Ultrazentrifugation wurden die zytosolischen Proteine auf eine Ni-Chelat-Säule aufgetragen (His•Bind™ Matrix; 2.2.2.5). Aufgrund des N-Terminalen His-Tags bindet Hirudin an die Matrix und konnte mit 250 mM Imidazol im Puffer eluiert werden (Abb.3.2).

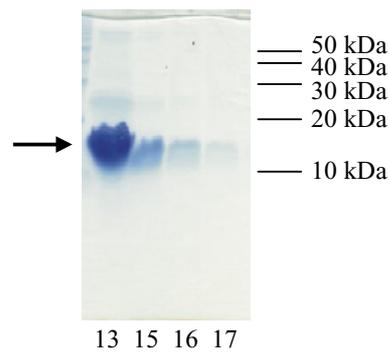


Abb.3.2 SDS-PAGE-Analyse zur Detektion von His-Hirudin nach der Elution von der Ni-Chelat-Matrix. Auf ein 17,5 –iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden je 10 μ l der Fraktionen 13, 15, 16, 17 (Fraktionsgrösse: 3 ml) aufgetragen. Es erfolgte eine Coomassie Färbung der Proteine (blau). Der Pfeil markiert die Laufhöhe von His-Hirudin.

Die Abb.3.2 zeigt die Analyse verschiedener Elutionsfraktionen der Ni-Chelat-Chromatografie. Anhand des Laufverhaltens konnte His-Hirudin identifiziert werden. Die His-Hirudin enthaltenden Fraktionen (13-17) wurden vereinigt, gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl bei 4 °C dialysiert und anschließend konzentriert. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt. Aus 1 l Kultur konnten 17,2 mg His-Hirudin gereinigt (95%) werden. Die erhaltene Protein-Lösung wurde im TPST-Sulfatierungsassay eingesetzt (2.2.2.9).

3.2 Herstellung von *hTPST1* Δ TMD zur Antikörper-Gewinnung

Um *hTPST1* eindeutig in einem Proteingemisch identifizieren zu können, sollte ein polyklonaler anti-*hTPST1*-Antikörper in unserem Auftrag von der Firma Biogenes (Berlin) hergestellt werden. Die N-terminale Transmembranhelix von *hTPST1* bewirkt, dass das Gesamtprotein in wässrigen Lösungen nicht löslich ist. Dies würde zu Problemen bei der Applikation des Proteins während der Immunisierung führen. Daher wurde die luminaire Domäne (ohne zytosolische Domäne und Transmembranhelix) als Antigen verwendet. Diese *hTPST1*-Mutante wird im Weiteren in dieser Arbeit als *hTPST1* Δ TMD bezeichnet.

Die DNA-Sequenz für *hTPST1* ohne Transmembranhelix enthielt zwei interne Nco I Schnittstellen. Da die Klonierung des Fragmentes in den Vektor pET-27b mod über die Restriktionsschnittstellen Nco I und BamH I erfolgen sollte, wurden für die Expression von *hTPST1* Δ TMD diese internen Schnittstellen mutiert. Dazu wurde ausgehend vom

Konstrukt pBlueScriptII KS(+) TPST1 in einem ersten Schritt eine interne Nco I Schnittstelle durch Mutagenese ohne Einfluss auf die Aminosäure-Abfolge und unter Beachtung des Codon-Gebrauchs geändert (2.2.1.7). Dafür wurden die Primer TPST1-06a und TPST1-07s verwendet (Tab.1 im Abschnitt 2.1.2). In einem zweiten Schritt wurde die zweite interne Nco I Schnittstelle ebenfalls ohne Änderung der Aminosäure-Abfolge mutiert. Gleichzeitig wurden der zytosolische N-Terminus und die sich anschließende Transmembrandomäne entfernt. Beide Schritte erfolgten durch eine PCR (2.2.1.1) mit den Primern TPST1-02a und TPST1-05s (Tab.1 im Abschnitt 2.1.2) und resultierten in dem DNA-Fragment, das für *hTPST1ΔTMD* kodiert. Die Klonierungsstrategie ist in Abb.3.3 noch einmal schematisch dargestellt.

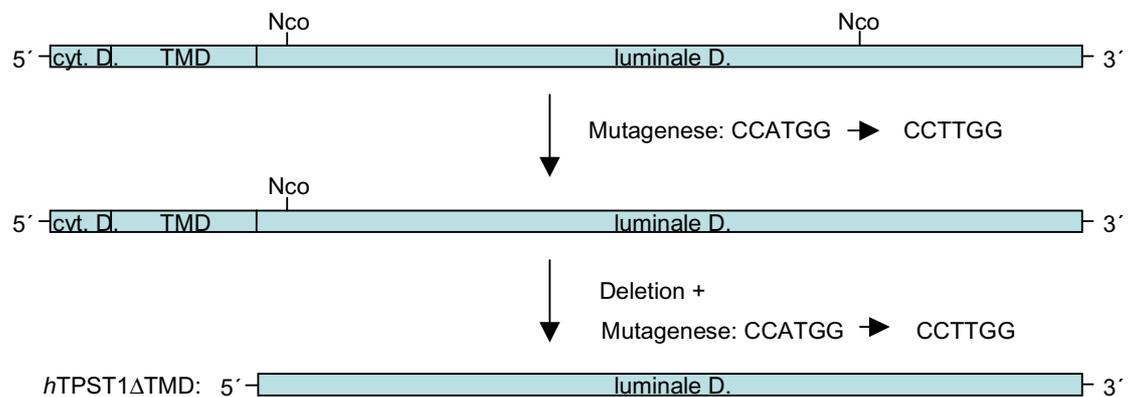


Abb.3.3 Schematische Darstellung der Herstellung von *hTPST1ΔTMD*. Ausgehend von einem intakten *hTPST1* Klon wurde im ersten Schritt durch Mutagenese eine Nco I Schnittstelle auf Nukleotidebene verändert, im zweiten Schritt wurde der N-Terminus deletiert und eine zweite Nco I Schnittstelle verändert. (D, Domäne; TMD, Transmembrandomäne; cyt., zytosolisch; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin)

Das so entstandene DNA-Fragment wurde in pET-27b mod kloniert. Dieser Vektor entspricht dem pET-27b-Vektor (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.), dem der *pelB*-Leader deletiert wurde. Zur Verifizierung der Nukleotid-Abfolge wurde der entstandene Klon pET-27b mod *hTPST1ΔTMD* mit den Primern T7 Promoter und T7 Terminator (Tab.1 im Abschnitt 2.1.2) sequenziert (2.2.1.5).

Für die Expression von *hTPST1ΔTMD* wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus RIL transformiert und 0,5 l logarithmisch wachsende Kultur (25 °C) mit 1 mM IPTG induziert (2.2.4.3). Nach 5 h wurden die Zellen geerntet. *hTPST1ΔTMD*

liegt in den Zellen als Einschlusskörper (Inclusion Bodies) vor. In *E. coli* werden Inclusion Bodies von exprimierten Proteinen gebildet, die im Zytosol der Wirtszellen nicht löslich sind. Die Reinigung von Proteinen aus Inclusion Bodies hat den Vorteil, dass die Proteinlösung fast vollständig aus dem unlöslich überexprimierten Protein besteht und die Reinigung schnell und unkompliziert ist (2.2.4.5). Aus 2,7 g Zellpellet (Feuchtgewicht) konnten 0,89 g Inclusion Bodies gereinigt werden. Diese wurden über Nacht in Guanidinium-Hydrochlorid, DTT und EDTA denaturiert (1 ml; 2.2.4.6). Über eine NAP-10 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurde die Proteinlösung zur besseren physiologischen Verträglichkeit für die Kaninchen umgepuffert (0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 6 M Guanidinium-Hydrochlorid) und anschließend auf 7 mg/ml aufkonzentriert. Die Proteinzusammensetzung wurde im Coomassie-gefärbten SDS-Gel überprüft (Abb.3.4).

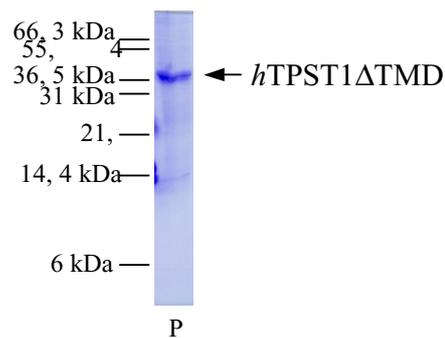


Abb.3.4 17,5%-iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der denaturierten, konzentrierten Proteinlösung nach Inclusion Body-Reinigung. Der Pfeil gibt die Laufhöhe von *hTPST1ΔTMD* an. (P, 2 μ l denaturierte, konzentrierte (7 mg/ml) Proteinlösung).

Die Abb.3.4 zeigt eine Analyse durch SDS-PAGE der konzentrierten, denaturierten Proteinlösung. Das durch Coomassie angefärbte Hauptprotein besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 40 kDa. Das *hTPST1ΔTMD*-Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 39684 Da. Das Protein in der denaturierten Proteinlösung steht somit damit im Einklang. Zur Verifizierung, dass es sich bei diesem Protein um *hTPST1ΔTMD* handelt, wurde die Protein-Bande aus dem SDS-Gel geschnitten, das Protein tryptisch verdaut und die entstandenen Peptide mittels MALDI-TOF analysiert (2.2.2.8). Die Auswertung ergab, dass es sich bei dem Protein um *hTPST1ΔTMD* handelt (nicht gezeigt).

1 mg der konzentrierten *hTPST1* Δ TMD-enthaltenden Proteinlösung (7 mg/ml) wurde der Firma Biogenes (Berlin) für die Antikörper-Generierung zur Verfügung gestellt. Unmittelbar bevor das Protein den Kaninchen injiziert wurde, erfolgte eine Verdünnung der Proteinlösung auf 1 mg/ml mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0.

Das von der Firma Biogenes entwickelte Antiserum wurde im Western-Blot auf seine Spezifität hinsichtlich *hTPST1* untersucht (Abb.3.5).

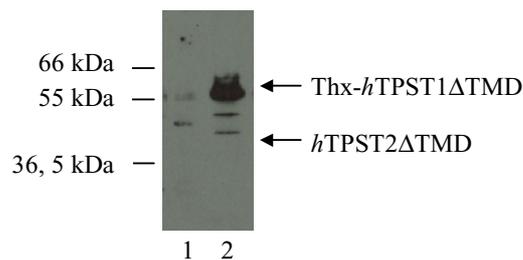


Abb.3.5 Western-Blot zur Überprüfung der Spezifität des anti-*hTPST1*-Serums. Denaturiertes *hTPST2* Δ TMD (Spur 1; 39496 Da; siehe auch Abschnitt 3.5.1) und denaturiertes Thx-*hTPST1* Δ TMD (Spur 2; 56813 Da, siehe auch Abschnitt 3.5.1) wurden im 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend durch Western-Blotting analysiert. Die PVDF-Membran wurde in 3% Milchpulver über Nacht bei RT blockiert. Der primäre Antikörper wurde 1:5000 in 1% Milchpulver verdünnt, die Inkubation erfolgte 2 h bei RT. Die Pfeile markieren die Laufhöhen von Thx-*hTPST1* Δ TMD und *hTPST2* Δ TMD.

Das verwendete anti-*hTPST1* Antiserum detektiert *hTPST1* Δ TMD-Konstrukte spezifisch (Spur 2 Abb.3.5). Eine Kreuzspezifität mit einem *hTPST2*-Konstrukt ist nicht gegeben (Spur 1 Abb.3.5). Die im Western-Blot sichtbaren Kreuzspezifitäten bei ca. 45, 47 und 50 kDa sind auf die in der Proteinlösung noch enthaltenen *E. coli* Proteine zurückzuführen (Abb.3.4). Es könnte sich hierbei um Chaperone handeln, die bei der Expression der heterologen Proteine koexprimiert werden. Diese beeinträchtigen die Identifizierung von *hTPST1* nicht. Damit stand ein Antiserum zur Verfügung, mit dem spezifisch *hTPST1* detektiert werden konnte.

3.3. Intrazelluläre Lokalisation von *hTPST1* in COS-7-Zellen

Indirekte Beweise lassen vermuten, dass die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten im Golgi-Apparat stattfindet (Niehrs *et al.*, 1990a). Eine zweifelsfreie Lokalisation der TPSTs, die diese Reaktion katalysieren, ist jedoch bisher nicht erfolgt. Deshalb wurde mit Hilfe von GFP-markiertem Protein die intrazelluläre Lokalisation von *hTPST1* nachgewiesen.

Zur Klonierung des entsprechenden Konstruktes wurde ausgehend von pBlueScript II KS(+) *hTPST1* mit dem Primer-Paar TPST1wtL_1s und TPST1L_3a ein PCR-Fragment amplifiziert (2.2.1.1), das in den Vektor pEGFP-N1 ligiert wurde (2.2.1.6). Die Überprüfung des Konstruktes erfolgte mittels Sequenzierung (2.2.1.5). Für die Transfektion von COS-7-Zellen wurden die Plasmide pEGFP-N1 *hTPST1* und der Vektor ohne Insertion (pEGFP-N1) als Kontrolle mit dem EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt. Mit je 3 µg Plasmid pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 3×10^5 COS-7-Zellen transfiziert (2.2.8.1). Nach 27 h wurden die Zellen auf den Glasplättchen fixiert und Golgin97 als Marker-Protein für den Golgi-Apparat und der Zellkern angefärbt (Abb.3.6).

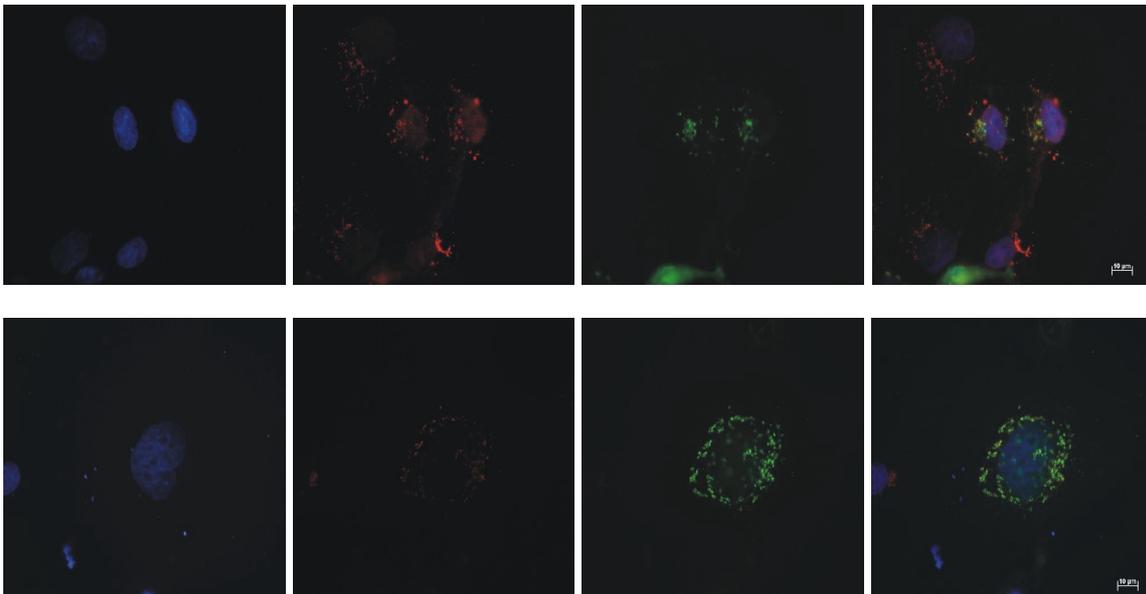
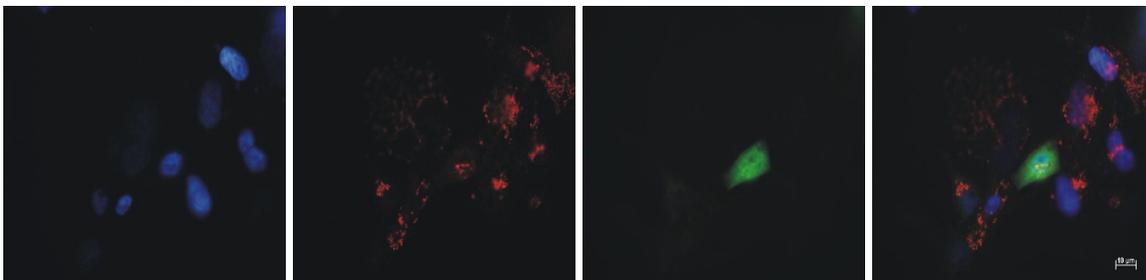
A *hTPST1*-GFP**B** GFP

Abb.3.6 Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von exprimiertem *hTPST1*-GFP (**A**) und GFP (**B**) in COS-7-Zellen. Je 3×10^5 COS-7-Zellen wurden mit 3 µg pEGFP-N1 *hTPST1* (**A**) bzw. pEGFP-N1 (**B**) transfiziert und für 27 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit DAPI und mit anti-Golgin97-Antikörper gefärbt. (Blau, Zellkern; Rot, Golgin97; Grün, exprimiertes Protein)

Die Abb.3.6 zeigt COS-7-Zellen, die *hTPST1*-GFP (A) bzw. GFP (B) exprimierten. Die gebildeten Proteine erscheinen im Fluoreszenz-Mikroskop grün. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Golgin97, ein Markerprotein im Golgi-Apparat, wurde mit anti-Golgin97-Antikörpern detektiert und ist in rot dargestellt. Teil A der Abb.3.6 zeigt *hTPST1*-GFP in einem Gebiet um den Zellkern. In den Bereichen, in denen *hTPST1*-GFP lokalisiert ist, konnte das Golgi-Protein Golgin97 ebenfalls detektiert werden. Aufgrund der Kolo-kalisation beider Proteine ist der Nachweis der intrazellulären Lokalisation von *hTPST1* im Golgi-Apparat erbracht. In den Bereichen, in denen Golgin97 ohne *hTPST1*-GFP vorkommt, handelt es sich um vesikuläre und tubuläre Strukturen, die sich vom *trans*-Golgi-Netzwerk gelöst haben und am sekretorischen Transport der Zelle beteiligt sind. Wird GFP ohne Fusion in COS-7-Zellen exprimiert, so ist das Protein innerhalb der gesamten Zelle verteilt (Abb.3.6B).

Damit ist erstmalig die Golgi-Lokalisation einer Tyrosylprotein Sulfotransferase *in vivo* nachgewiesen worden. Es konnte demnach die von Baeuerle und Huttner vor 16 Jahren aufgestellte Hypothese, dass die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten an Proteinen im Golgi-Apparat erfolgt, durch die Lokalisation der diese Reaktion katalysierenden Proteine bewiesen werden (Baeuerle *et al.*, 1987).

Der Nachweis von TPST1 im Golgi-Apparat steht im Einklang mit den Substraten der TPSTs. Diese Substrate werden unter anderem von Endothelzellen gebildet und werden in Abhängigkeit von äußeren Regulatoren exprimiert und in den Blutstrom abgegeben.

3.4 Laminare Schubspannung induziert TPST-Isoform-Wechsel in HUVEC

Humane Endothelzellen der Blutgefäße sind permanent Schubspannung ausgesetzt. Diese Schubspannung induziert u. a. den Ausstoss vasoaktiver Peptide, die eine bedeutende Rolle bei Herz-Kreislaferkrankungen spielen und zur Ausübung ihrer Funktion häufig Tyrosyl-sulfatiert sind. Dabei sind Änderungen in der Gen-Expression der Endothelzellen in Abhängigkeit von der Fluss-Stärke zu beobachten. Ob die Schubspannung einen Einfluss auf die Expression der *hTPSTs* hat, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden.

3.4.1 Expression von *hTPST1*- und *hTPST2*-mRNA in HUVEC

Um den Einfluss von Schubspannung auf die Transkription von *hTPST1* und *hTPST2* in humanen Zellen der Nabelschnurvene (HUVEC) untersuchen zu können, musste in einem ersten Versuch verifiziert werden, dass beide Gene in den Endothelzellen transkribiert werden. Dazu wurden primäre HUVEC isoliert und kultiviert (2.2.3.10). Eine Primärzellkultur unterliegt bei diesen Versuchen der geringsten Adaptation an nicht-natürliche Zellkulturbedingungen, sodass die Zell-Situation in Kultur der *in vivo* Situation am ehesten entspricht. Aus den HUVEC wurde die RNA isoliert und mittels reverser Transkription und PCR analysiert (2.2.7.2). Für die reverse Transkription wurden Zufalls-Hexamer Primer verwendet, für die PCR die Primerpaare TPST1-kurz und TPST1-kurz as, bzw. TPST2-kurz und TPST2-kurz as (Tab.1 im Abschnitt 2.1.2).

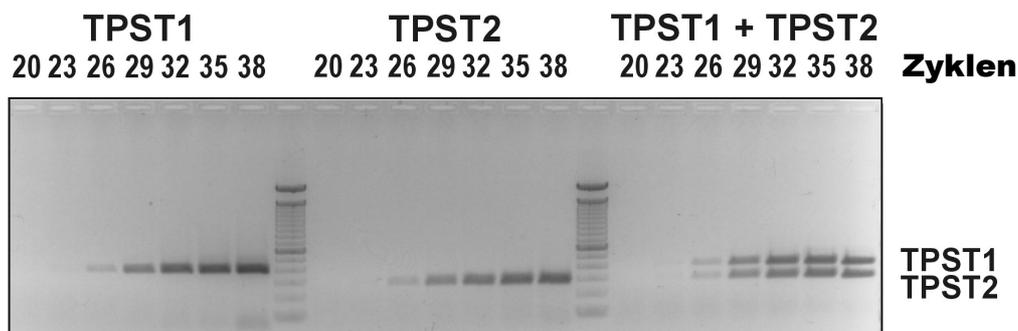


Abb.3.7 Expression von *hTPST1*- und *hTPST2*-mRNA in primärer HUVEC Kultur. *hTPST1*- und *hTPST2*-spezifische DNA-Fragmente wurden nach reverser Transkription von mRNA aus HUVEC-Primärkultur amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. *hTPST1*- und *hTPST2*-Fragmente wurden einzeln oder simultan mit den angegebenen Zykluszahlen amplifiziert.

In Abb.3.7 ist das Ergebnis der PCR dargestellt. Beide Isoformen konnten nach einer ähnlichen Zykluszahl ($n = 26$) im Agarose-Gel detektiert werden. Bei ansonsten völlig identischen PCR-Bedingungen lässt dieses Ergebnis auf eine ähnliche Anzahl mRNA-Moleküle für beide Isoformen innerhalb von HUVEC schließen.

Werden beide cDNAs im gleichen Reaktionsansatz durch den Einsatz beider Primerpaare im PCR-Ansatz amplifiziert, so ändern sich die Amplifikationsraten beider cDNAs im Vergleich zu den singulären Ansätzen nicht. Eine Amplifikation von *hTPST1*- und *hTPST2*-Fragmenten im gleichen Reaktionsansatz garantiert identische experimentelle Konditionen und ermöglicht die gleichzeitige Detektion beider Fragmente. Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Versuche diese kombinierte PCR angewendet.

3.4.2 Induktion des Isoform-Wechsels von *hTPST1* zu *hTPST2* durch Schubspannung

Schubspannung hat einen großen regulatorischen Einfluss auf die Transkription vieler Gene in Endothelzellen. Die Transkription kann dabei entweder erhöht oder erniedrigt werden. Dies führt zu einer geänderten Proteinzusammensetzung innerhalb der Zelle, die sich in deren Funktionsausübung widerspiegelt. Welchen Einfluss die Schubspannung auf die Transkription der *hTPST*-Gene ausübt, ist bisher nicht untersucht worden.

Deshalb wurden primäre HUVEC-Kulturen in einem Plattenkegel-Viskosimeter 24 h Schubspannung unterschiedlicher Dosis ausgesetzt (2.2.7.1). Im Anschluss daran wurde die mRNA isoliert und im Hinblick auf *hTPST1* und 2 quantifiziert (2.2.7.2).

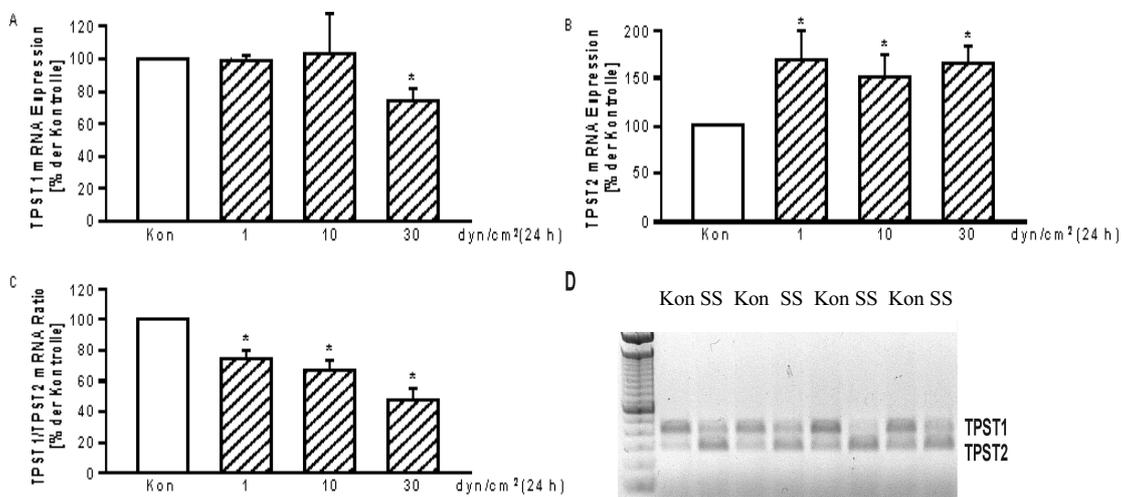


Abb.3.8 Dosis-abhängiger Isoform-Wechsel von *hTPST1* zu *hTPST2* in Abhängigkeit von laminarer Schubspannung in HUVEC. mRNA-Expression von *hTPST*-Isoformen nach 24 h Induktion von venösem (1 dyn/cm²) und zwei arteriellen Dosen (10 dyn/cm² und 30 dyn/cm²) Schubspannung. Die mRNA-Expression von *hTPST1* (A) und *hTPST2* (B) und die entsprechende *hTPST1/hTPST2*-Ratio (C) wurde durch Reverse Transkription und PCR bestimmt. In (D) ist der Isoform-Wechsel im Agarose-Gel (Kon, 0 dyn/cm²; SS, 30 dyn/cm², 24 h) gezeigt. Alle Daten wurden gegen stationäre interne Kontrollen (Kon) normalisiert und als Mittelwert \pm SEM angegeben; $n = 74$. $*P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle ohne Schubspannung.

In einem ersten Versuch wurden die Endothelzellen 24 h einer arteriellen laminaren Schubspannung von 0,1, 10 oder 30 dyn/cm² ausgesetzt (Abb.3.8). Die Transkription von *hTPST1*-mRNA unter arterieller Schubspannung wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen bis auf 67% des Ausgangswertes reduziert (Abb.3.8A). Die *hTPST2*-mRNA-Expression war im Gegensatz dazu auf 176% des Ausgangswertes gestiegen (Abb.3.8B). Eine Regulation der *hTPST2*-mRNA-Expression wurde schon bei

venösem Fluss (niedrige Schubspannung bei 1 dyn/cm²) beobachtet, wobei die Änderung der *hTPST1*-mRNA-Expression erst bei höheren arteriellen Flussraten stattfindet (Schubspannung >10 dyn/cm²). Abb.3.8C zeigt das mRNA-Expressions-Verhältnis beider *hTPSTs* und stellt den Isoform-Wechsel dar. In Teil D der Abbildung ist die Änderung der mRNA-Expressionsraten von *hTPST1* und *hTPST2* im Agarose-Gel gezeigt. Durch Schubspannung kann also ein Fluss-abhängiger Wechsel der beiden *hTPST*-Isoformen induziert werden.

3.4.3 Expression von *hTPST1* in HUVEC

Die Änderung von mRNA-Mengen innerhalb einer Zelle muss sich nicht notwendigerweise in der dazugehörigen Proteinmenge widerspiegeln. In diesem Teilabschnitt wurde deshalb untersucht, inwiefern sich das Absinken der *hTPST1*-Transkription auf die Proteinmenge auswirkt.

Von acht unabhängigen HUVEC-Proben, die 24 h einer Schubspannung von 30 dyn/cm² ausgesetzt waren, wurden Gesamtzelllysate präpariert, denen der *hTPST1*-Proteingehalt mit Hilfe des anti-*hTPST1*-Antiserums (3.2) durch Western-Blot-Analyse bestimmt wurde. Das generierte Antiserum detektiert spezifisch *hTPST1*, nicht aber *hTPST2* (3.2).

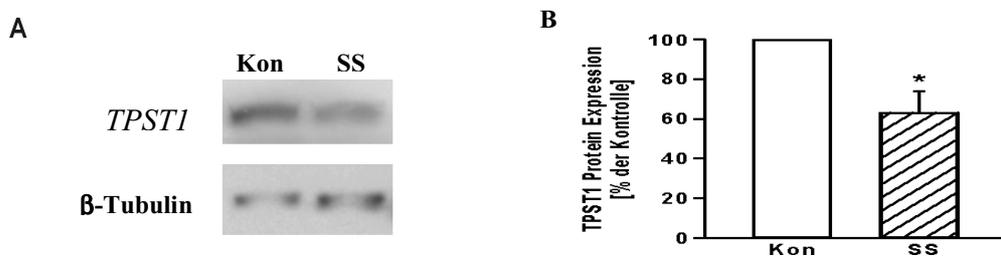


Abb.3.9 Herabregulation von *hTPST1*-Gen-Produkt durch arterielle Schubspannung (24 h, 30 dyn/cm²). Die *hTPST1*-Protein-Expression wurde im Western-Blot mittels eines anti-*hTPST1*ΔTMD polyklonalen Antiserums untersucht (A, singuläres Beispiel) und densitometrisch quantifiziert (B). Zur Ladekontrolle des SDS-Polyacrylamid-Geles (50 μg Gesamt-Protein pro Spur) wurde monoklonaler anti-β-Tubulin-Antikörper verwendet. ($n = 8$, $*P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle ohne Schubspannung) (Kon, 0 dyn/cm²; SS, 30 dyn/cm², 24 h)

Abb.3.9 zeigt die Western-Blot-Analyse, in denen die Verringerung des *hTPST1*-Proteingehaltes in humanen Nabelschnur-Endothelzellen nach 24 h Schubspannung dargestellt ist. Als Referenz wurden HUVEC-Proben verwendet, die keiner

Schubspannung ausgesetzt waren. Die *hTPST1*-Proteinmenge betrug nur noch 66% im Vergleich zu den Kontrollen und reflektiert damit die *hTPST1*-mRNA-Situation (3.4.2). Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass die Regulation der *hTPST*-Expression auf der Transkriptionsebene erfolgt und nicht auf der Translationsebene. Die mRNA-Werte sind demnach für die Protein-Werte repräsentativ. Deshalb wurden für die weiteren Quantifizierungen die mRNA-Expressions-Raten ausgewertet.

3.4.4 Zeitabhängigkeit der *hTPST*-mRNA-Regulation

Als Antwort auf Schubspannung kann die Regulation der Transkription *in vivo* unterschiedlich schnell erfolgen. In diesem Teilversuch wurde die Geschwindigkeit der Regulation der mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Schubspannung (30 dyn/cm^2) untersucht.

Primäre HUVEC-Kulturen wurden 1 h, 4 h oder 24 h Schubspannung ausgesetzt. Die mRNA wurde isoliert und ihr *hTPST1*- bzw. *hTPST2*-Gehalt quantifiziert (Abb.3.10).

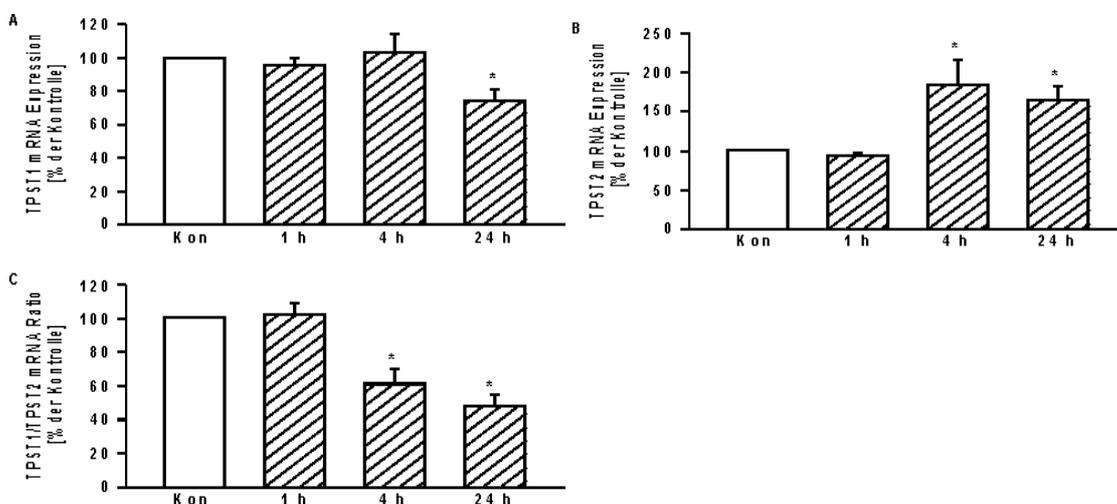


Abb.3.10 Zeit-Abhängigkeit der *hTPST1*- und *hTPST2*-mRNA-Expression als Antwort auf arterielle Schubspannung in HUVEC. Die Zellen wurden für 1 h, 4 h bzw. 24 h laminarer Schubspannung (30 dyn/cm^2) ausgesetzt. Anschließend wurde ihr *hTPST1*- (A) bzw. *hTPST2*- (B) mRNA-Gehalt und die dazugehörige *hTPST1*/*hTPST2*-Ratio (C) mittels Reverser Transkription und PCR bestimmt. Alle Ergebnisse wurden gegen stationäre interne Kontrollen (Kon) normalisiert und geben den Mittelwert \pm SEM an; $n = 7$. * $P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle ohne Schubspannung. (Kon, 0 dyn/cm^2)

Abb.3.10 zeigt die Zeitabhängigkeit der *hTPST*-mRNA-Regulation. Nach 1 h konnte keine Änderung in der mRNA-Expression beider Isoformen ermittelt werden (Abb.3.10A

und B). Die *hTPST2*-Expression erreichte nach 4 h Schubspannung ihren Maximalwert von 169% des Ausgangswertes (Abb.3.10B), während eine Änderung bei der *hTPST1*-mRNA-Expression (73%) erst nach 24 h beobachtet werden konnte (Abb.3.10A). Somit handelt es sich bei *hTPST1* um einen „late-responder“, während *hTPST2* schneller auf diesen Stimulus reagiert. Diese unterschiedliche Zeit-Abhängigkeit deutete auf unterschiedliche Regulationen der Gen-Expression hin.

3.4.5 Einfluss von Inhibitoren auf den *hTPST*-Isoform-Wechsel

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen der *hTPST1*- und *hTPST2*-mRNA-Expression auf Schubspannung, wurde eine unterschiedliche Regulation der Transkription dieser Gene vermutet. Um dies bestätigen zu können, wurden den HUVEC-Proben 1 h vor der Applikation von Schubspannung Inhibitoren zugesetzt. Diese Inhibitoren waren RO-31-822 (RO) zur Blockade der Protein Kinase C (PKC) Signalkaskade und Herbimycin A (HA) als Inhibitor von Tyrosyl Kinasen. Nach der Applikation von Schubspannung wurde die mRNA-Expression von *hTPST1* und *hTPST2* quantifiziert (Abb.3.11).

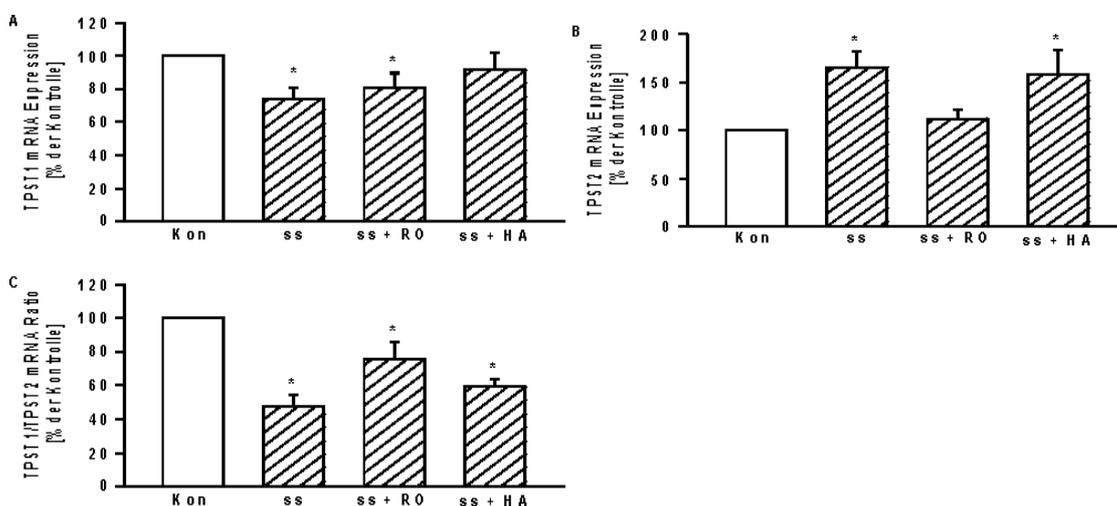


Abb.3.11 Regulation des Schubspannungs-abhängigen *hTPST*-Isoform-Wechsels involviert Protein Kinase C und Tyrosyl Kinasen. Dargestellt ist der Effekt eines Inhibitors der Protein Kinase C (1 μ M RO-31-822; RO) und eines Inhibitors von Tyrosyl Kinasen (1 μ M Herbimycin A; HA) auf die mRNA-Expression von *hTPST1* (A) und *hTPST2* (B) und die entsprechende *hTPST1/hTPST2*-mRNA-Ratio (C) als Antwort auf arterielle laminare Schubspannung in HUVEC (mittels Reverser Transkription und PCR-Analyse bestimmt). Die Angaben sind in Prozent der statischen Kontrolle (bei RO und HA: Kontrollen mit Inhibitor, ohne Schubspannung) als Mittelwert \pm SEM; $n = 3$. * $P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle ohne Schubspannung. (Kon, 0 dyn/cm²)

In Abb.3.11 ist der Einfluss zweier Inhibitoren auf die Regulation der mRNA-Expression von *hTPST1* und *hTPST2* dargestellt. In Teil A der Abbildung ist zu erkennen, dass die Verringerung der *hTPST1*-mRNA-Expression aufgrund von Schubspannung durch den Einfluss eines Tyrosyl Kinase Inhibitors (HA) weitestgehend verhindert wird. Die Erhöhung der *hTPST2*-mRNA-Expression durch Schubspannung wird durch die Zugabe eines PKC-Inhibitors (RO) vollständig unterdrückt (Abb.3.11B). Der Inhibitor von Tyrosyl Kinasen hat keinen Einfluss auf die *hTPST2*-mRNA-Erhöhung. In Abb.3.11C ist der Einfluss der beiden Inhibitoren auf das mRNA-Verhältnis dargestellt.

Diese Daten beweisen eine unabhängige Regulation der mRNA-Expression beider *hTPST*-Isoformen in HUVEC als Antwort auf Schubspannung. Die *hTPST1*-mRNA-Expression involviert Tyrosyl Kinasen, während die Erhöhung der mRNA-Expression der zweiten *hTPST*-Isoform durch die PKC-abhängige Signalkaskade reguliert wird.

3.4.6 Identifizierung *hTPST*-spezifischer Substrate in HUVEC-Überständen

Durch Schubspannung wird die Transkription vieler Gene in Endothelzellen geändert. Diese Auf- bzw. Abregulation der Genexpression führt in den Zellen zu einer veränderten Proteinzusammensetzung. Viele Proteine endothelialer Zellen sind an Tyrosyl-Resten sulfatiert und sind in sezernierter Form an Prozessen der Blutgerinnung und der Entzündungshemmung beteiligt. Ausgehend von diesem geänderten Substratspektrum für die TPSTs sollte es möglich sein, für beide Isoformen spezifische, sezernierte Substrate aus dem Überstand der HUVEC-Kulturen zu identifizieren.

Ein möglicher proteomischer Ansatz stellt die 2-D Gelelektrophorese dar (2.2.2.7). Dabei werden die Proteine in der ersten Dimension entsprechend ihrer Ladung, in der zweiten Dimension entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Dadurch kann ein komplexes Proteingemisch breit aufgefächert werden. In den durchgeführten Versuchen wurden Zellkultur-Überstände (450 µg Gesamt-Proteingehalt) nach 24 h Schubspannung von 1 dyn/cm² mit 30 dyn/cm² miteinander und mit dem unverbrauchten Medium verglichen. Nach der Auftrennung im pH-Bereich 3-10 wurden die Proteine in einem 10%-igen oder in einem 17,5%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Silber-Färbung sichtbar gemacht. Ein Beispiel ist in Abb.3.12 gezeigt.

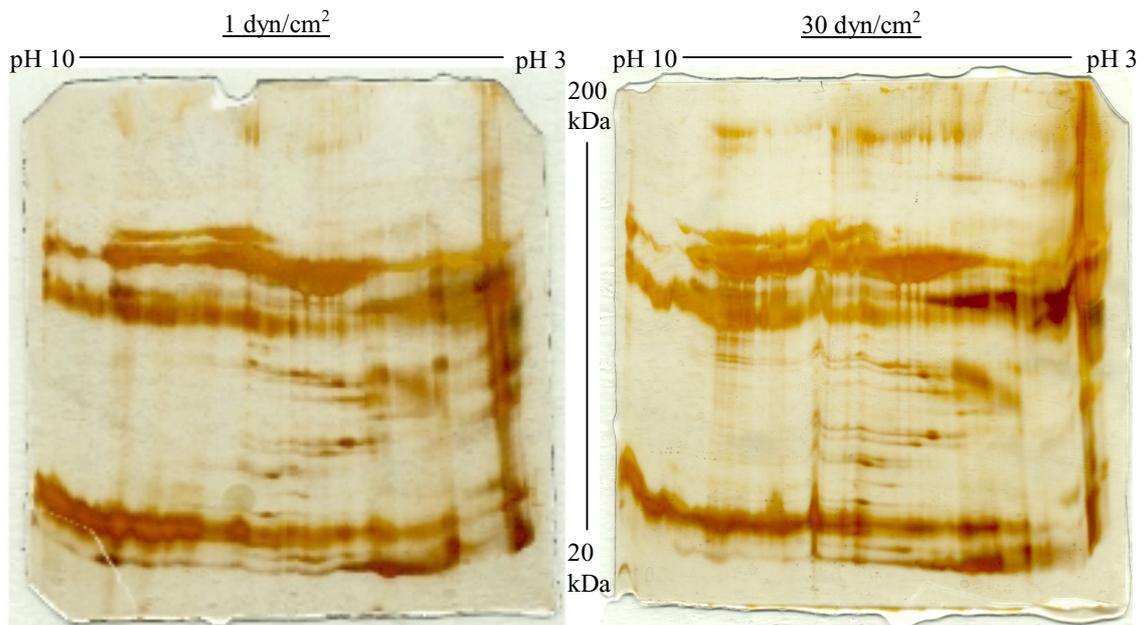


Abb.3.12 2-Dimensionale Gelelektrophorese von Überständen von HUVEC-Kulturen nach 24 h Schubspannung bei 1 dyn/cm^2 bzw. 30 dyn/cm^2 . Je $450 \mu\text{g}$ Gesamtprotein wurden in der ersten Dimension auf einem Immobiline™ Dry Strip (pH 3-10NL, 13 cm) isoelektrisch fokussiert und in der zweiten Dimension in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel dem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Silber-Färbung nach Shevchenko.

In den SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde nach Protein-Spots gesucht, die im Vergleich zu der Medium-Kontrolle oder im Vergleich zueinander (Abb.3.12) spezifisch auftraten. Eine Diskriminierung zwischen zwei Gelen war schwierig. Es konnten dabei nur Proteine lokalisiert werden, deren Gehalt in den SDS-Polyacrylamid-Gelen leicht variierte. Diese Proteine wurden durch tryptischen Verdau aus dem Gel gelöst und mittels MALDI-TOF (2.2.2.8) als Medien-Zugaben (z.B. Proteine aus Rind, die im FCS enthalten sind) identifiziert.

Durch diesen Versuchsansatz ist es leider nicht gelungen, *hTPST1*- und *hTPST2*-spezifische Substrate zu identifizieren. Der Grund hierfür liegt in der geringen Menge der von den HUVECs in das Medium sezernierten Proteine. Diese sind in der Masse der Proteine des Zellkulturmediums (Endothelzellmedium 10 und fetales Kälberserum; 2.1.3), die die Zellen zum Überleben benötigen, nicht identifizierbar.

Da es *in vivo* nicht gelungen ist, spezifische Substrate für *hTPST1* und *hTPST2* zu identifizieren, wurde im weiteren eine andere Strategie gewählt. In *in vitro*-Versuchen

sollte die Charakterisierung der *hTPSTs* im Hinblick auf ihre Isoform-Spezifitäten möglich sein. Dazu ist allerdings die heterologe Expression und Reinigung der *hTPSTs* notwendig. Eine authentische Isolierung der *hTPSTs* aus humanem Gewebe scheidet aufgrund der geringen *hTPST*-Menge, der Instabilität der gereinigten Proteine und der teilweise lipophilen Eigenschaften hervorgerufen durch die Transmembrandomäne aus. Aus diesen Gründen sollte die heterologe Expression in löslicher Form (ohne Transmembrandomäne) erfolgen.

3.5 Expression von aktivem Thioredoxin-*hTPST1ΔTMD* *in vitro*

In den vorhergegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die *hTPSTs* *in vivo* unterschiedlich reguliert und exprimiert werden. Die vermutete Substratspezifität der Isoformen konnte nicht nachgewiesen werden. Um diese Substrat-Untersuchungen *in vitro* durchführen zu können und als Grundvoraussetzung für die Lösung der Proteinstrukturen, ist das Vorhandensein von in wässrigen Lösungen aktiven Proteinen notwendig. Die Aktivität kann mittels des TPST-Enzymaktivitätsassays überprüft werden (2.2.2.9). Dabei wird die Bindung eines radioaktiven Sulfuryl-Restes an ein Protein gemessen. Ob die Expression löslicher (ohne Transmembrandomäne) *hTPSTs* in aktiver Form prinzipiell möglich ist, sollte in ersten *in vitro* Transkriptions-Translations-Versuchen geklärt werden. Dazu wurde das in Abschnitt 3.2 hergestellte *hTPST1ΔTMD*-Konstrukt in pET-32a kloniert. Das daraus entstehende Protein trägt N-terminal einen Thioredoxin-Tag (Thx-), der die Löslichkeit des Proteins erhöht. Zur Expression wurde das Rapid Translation System RTS500 *E.coli* HY von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) verwendet. Der Versuch wurde nach den Angaben des Herstellers über 24 h bei 28 °C durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurden Protein Disulfid Isomerase (PDI, 384 U/mg; Calbiochem) und die Chaperone GroE und DnaK während der Synthesephase dem Mix zugesetzt. Die PDI wurde vorher in 10 mM Tris/HCl pH 7,0, 0,5 mM GSSG, 1,4 mM GSH gelöst und für 15 min bei 8 °C inkubiert. Um das Redoxverhältnis des Synthesemixes nicht zu beeinflussen, wurden danach GSSG und GSH durch Reinigung an einer NAP-10 Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) entfernt und die aktivierte PDI in den Rekonstitutions-Puffer des Synthese-Kits überführt. Es wurden 1 µM aktivierte PDI, 125 µl GroE und 125 µl Dnak (Chaperone-

Mixe der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Reaktionsdauer betrug ebenfalls 24 h bei 28 °C. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben zum Pelletieren von Aggregaten zentrifugiert. Die Pellets und die Überstände wurden im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, die Überstände darüber hinaus im Enzymtest auf ihre Aktivität untersucht (2.2.2.9; Abb.3.13).

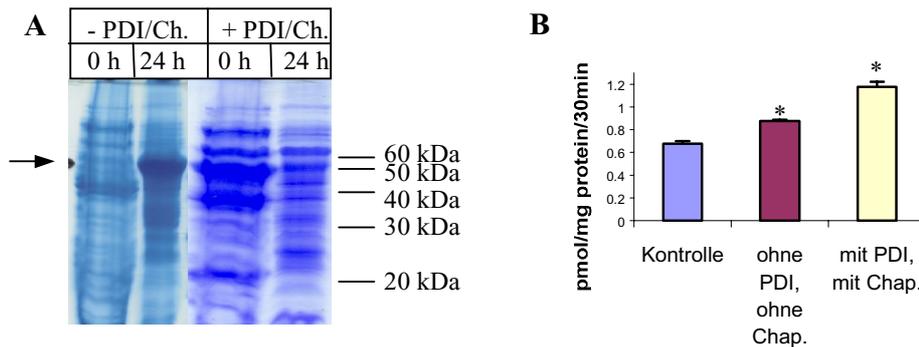


Abb.3.13 Herstellung von löslichem und aktivem Thx-*hTPST1ΔTMD*. Die Synthese erfolgte im Rapid Translation System RTS500 *E.coli* HY von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) mit 8,8 μg pET-32a *hTPST1ΔTMD* bei 28 °C innerhalb von 24 h. Im zweiten Ansatz wurden 1 μM aktivierte Protein Disulfid Isomerase (PDI) und Chaperone-Mixe mit GroE und DnaK (Ch.; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben. **A**, nach der Synthese wurden lösliche und unlösliche Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (blau). Der Pfeil markiert die Laufhöhe von Thx-*hTPST1ΔTMD* im SDS-Polyacrylamid-Gel. **B**, 10 μl Gesamt-Lysate (ca. 300 μg Gesamt-Protein) wurden auf *hTPST*-Aktivität untersucht. Dargestellt ist der Umsatz ³⁵S-PAPS in pmol/mg Protein innerhalb von 30 min ($n = 3$; * $p < 0,0002$ gegenüber der Kontrolle).

Die Abb.3.13 zeigt die Ergebnisse der *in vitro* Translation und Transkription von Thx-*hTPST1ΔTMD*. Im Reaktionsansatz ohne PDI und Chaperone konnte im Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel eine Proteinbande angefärbt werden, deren apparentes Molekulargewicht dem theoretischen (56813 Da) entspricht (Abb.3.13A). Werden dem Reaktionsansatz PDI und Chaperone zugesetzt, so konnte keine zusätzliche Proteinbande im entsprechenden Molekulargewichtsbereich detektiert werden (Abb.3.13A). Werden die löslichen Proteinfractionen beider Ansätze im TPST-Enzymaktivitätsassay eingesetzt, so wurde im ersten Ansatz eine Aktivität gemessen, die im zweiten Ansatz noch gesteigert wurde (Abb.3.13B). Es ist demnach möglich, lösliches und aktives Thx-TPST1ΔTMD (56813 Da) zu synthetisieren. Auf die Überprüfung der unlöslichen Reaktionsprodukte wurde verzichtet, da für die geplanten *in vitro*-Untersuchungen die *hTPST*s löslich vorliegen müssen.

Der zweite Ansatz zeigt, dass nach Zugabe von PDI und Chaperonen zum Synthesemix die Expression von aktivem *hTPST1ΔTMD* noch gesteigert werden konnte. Diese Steigerung in der Aktivität weist auf einen komplexen Faltungsvorgang der Proteine hin, bei denen Chaperone unterstützend wirken. Außerdem müssen wahrscheinlich Disulfidbrücken ausgebildet werden.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass die Expression von *hTPST1ΔTMD* und wahrscheinlich auch von *hTPST2ΔTMD* in *E. coli* möglich ist. Auf die weitere Verwendung des Rapid Translation Systems RTS500 *E. coli* HY wurde verzichtet, da mit diesem System nur geringe Proteinmengen synthetisiert werden können und weil dessen Einsatz sehr kostenintensiv ist. Deshalb wurde im folgenden versucht, *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in *E. coli* herzustellen.

3.6 Expression von *hTPSTs* in *E. coli* und Löslichkeitsstudien

3.6.1 Expression von humanen Tyrosylprotein Sulfotransferasen in *E. coli*

Aufgrund der Voruntersuchungen im Rapid Translation System RTS500 *E. coli* HY von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) sollte die heterologe Expression von löslichen *hTPST1*- und *hTPST2*-Konstrukten in *E. coli*-Stämmen möglich sein. Wie Tabelle 7 (Anhang) zeigt, wurden dazu mehrere Konstrukte hergestellt und die Löslichkeit der exprimierten Proteine untersucht.

Alle Konstrukte, die ohne die Transmembran-Domäne in *E. coli* exprimiert wurden (*hTPST1ΔTMD*, *hTPST2ΔTMD*), waren in jedem Fall unlöslich. Um zu vermeiden, dass die Proteine während des Zell-Aufschlussverfahrens aggregierten, wurden hierfür verschiedene Puffer getestet (pH 7,0, pH 11,0, pH 4,5, 2 M Guanidinium-Hydrochlorid, 250 mM Sukrose oder 30 % (w/v) Glycerol / 10 % (w/v) Triton X-100; 2.2.4.4 und Tab.7 im Anhang). Nur bei einem stark basischen Puffer (pH 11,0) konnte ein Teil der Proteine in Lösung gehalten werden. Da bei diesem pH-Wert die TPSTs nicht aktiv sind (Niehrs *et al.*, 1990a; William *et al.*, 1997; Ramaprasad *et al.*, 1998b), wurde der Puffer nach dem Aufschluss von pH = 11,0 durch Dialyse neutralisiert (siehe Abschnitt 3.6.2).

Weiterhin wurde versucht, durch N-terminale Protein-Fusionen lösliche Proteine zu kreieren (Thx-*hTPST1ΔTMD*, Thx-*hTPST2ΔTMD*, NusA-*hTPST1ΔTMD*; Tab.7 im

Anhang). Dabei lieferten sowohl der Thioredoxin-, als auch der NusA-Tag keine verbesserte Löslichkeit, obwohl dies schon für einige andere Proteine gezeigt werden konnte (LaVallie *et al.*, 1993). Die Verwendung von Origami(DE3)-Zellen, die durch eine Mutation in der Thioredoxin- und der Glutathion-Reduktase ein weniger reduzierendes Mileu im Zytoplasma, ähnlicher dem im Golgi-Apparat, zulässt, führte ebenfalls nicht zur Expression von löslichem Thx-Protein (Tab.7 im Anhang). Wiederum zeigte sich nach Aufschluss der Zellen in einem basischen Puffer (pH 9,5, pH 11) ein Teil der Zielproteine in Lösung. Je basischer der Puffer war, umso länger konnten die Proteine in Lösung gehalten werden.

Um die Löslichkeit der Proteine bei höheren Protein-Konzentrationen innerhalb der Zelle zu erhöhen, wurden *hTPST*-Fusionsproteine kloniert, die N-terminal Sekretionssequenzen (pE1B, DsbA, DsbC) enthielten. Diese Sekretionssequenzen vermitteln den Transport der Proteine ins Periplasma der *E. coli*-Zellen. Durch Fusion mit pE1B wurde die Expression von *hTPST1ΔTMD* fast vollständig unterdrückt. Die DsbA- und DsbC-Chimären wurden bei höheren Expressions-Temperaturen (30 °C) gut exprimiert. Allerdings erfolgte keine Sekretion der Zielproteine ins Periplasma.

Um einen Einfluss des die Transmembrandomäne mit der aktiven Domäne verbindenden Linkers auf die Aggregation der Proteine nach Expression in *E. coli* auszuschließen, wurden zwei weitere Mutanten kloniert (*hTPST2ΔTMD C8A*, *hTPST2Δ-42AA*; Tab.7 im Anhang). Im Konstrukt *hTPST2ΔTMD C8A* wurde der Cysteyl-Rest, der am nächsten zum N-Terminus ist, nach Alanin mutiert. *hTPST2Δ42AA* ist ein kürzeres Fragment, das seinen N-Terminus am hypothetischen ersten β -Faltblatt der aktiven Domäne besitzt. Beide Kontrukte wurden nicht exprimiert.

Ein weiterer möglicher Grund für die Aggregation der *hTPST*s könnte darin bestehen, dass *hTPST1* und *hTPST2* *in vivo* stabilisierende Heterodimere bilden. Um das auszuschließen, wurden beide Proteine koexprimiert (Tab.7 im Anhang). Auch dies führte zur Aggregation beider Isoformen.

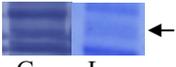
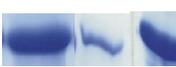
Werden Proteine in *E. coli* unlöslich exprimiert, handelt es sich häufig um die Bildung von Einschlusskörpern (Inclusion Bodies; Rudolph und Lilie, 1996). Da dies auch auf die *hTPST*s zutrifft, wurden die Inclusion Bodies gereinigt und die Proteine entfaltet und

anschließend zurückgefaltet. Diese Untersuchungen sind in Abschnitt 3.6.3 ausführlicher dargestellt.

3.6.2 Einfluß verschiedener Pufferwechsel auf *hTPST* in Lösung

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, konnte ein bestimmter Anteil der exprimierten *hTPST1ΔTMD*-, *hTPST2ΔTMD*-, *Thx-hTPST1ΔTMD*- und *Thx-hTPST2ΔTMD*-Proteine durch Aufschluss der Zellen mit basischem Puffer (0,1 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 1,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,02% (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT) in Lösung gehalten werden. Um die Proteine langsam in einen pH-Bereich zu überführen, indem sie maximale Aktivität aufzeigen (pH 6,5 - 7,0; Niehrs *et al.*, 1990a; William *et al.*, 1997), wurden Gesamt-Zelllysate, die mit dem basischen Puffer aus den Expressionskulturen hergestellt worden waren, gegen neutrale Puffer dialysiert. Mit den verschiedenen Konstrukten wurden zunächst unterschiedliche Puffer getestet (Tab.3).

Tab.3 Dialyse von TPST-Konstrukten im basischen Milieu gegen ausgewählte Puffer.

Konstrukt	Puffer	Ergebnis
<i>hTPST1ΔTMD</i>	50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02% (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT; 4 °C	 G L U <i>hTPST1ΔTMD</i> präzipitiert
<i>hTPST2ΔTMD</i>	50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02% (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT; 4 °C	 G L <i>hTPST2ΔTMD</i> präzipitiert
<i>Thx-hTPST1ΔTMD</i>	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl; 4 °C	 G L U <i>Thx-hTPST1ΔTMD</i> präzipitiert sukzessive
<i>Thx-hTPST2ΔTMD</i>	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl; 4 °C	 G L U <i>Thx-hTPST1ΔTMD</i> präzipitiert sukzessive

(G, Gesamtzelllysate ; L, lösliche Fraktion ; U, unlösliche Fraktion)

Die in diesem Vortest durchgeführten SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass die verwendeten *hTPSTΔTMD*-Konstrukte aggregierten und präzipitierten (Tab.3) Diese Protein-Konstrukte ließen sich demnach nicht in einen neutralen pH-Bereich überführen. Es ist allerdings möglich, durch die Wahl eines geeigneten Puffers, pH-Wertes und

Pufferzusatzes einen stabilisierenden Effekt auf ein bestimmtes Zielprotein auszuüben (Lilie *et al.*, 1998). Da mit der bisher gewählten Puffer-Zusammensetzung die Löslichkeit der *hTPST* Δ TMDs nicht erreicht wurde, erfolgte im folgenden mehrere Screens, die Aufschluss über *Thx-hTPST1* Δ TMD stabilisierende Zusätze bringen sollten. Ausgangspunkt war erneut die in pH 11 lösliche Protein-Fraktion.

Im ersten Screen wurde der Einfluss von Salzkonzentration, Zucker und DTT untersucht. Als Puffer-Substanz wurde Tris/HCl mit einem pH-Wert von 6,7 gewählt. Dies entspricht dem pH-Optimum der *hTPST*s. Die bei pH 11 löslichen Proteine wurden durch IMAC weiter aufgereinigt (2.2.2.5). Diese vorgereinigte Proteinlösung wurde anschließend im Screen gegen die folgenden Puffer-Lösungen bei 4 °C, RT und 37 °C dialysiert:

20 mM Tris/HCl pH 6,7	+ 4 mM NaCl
	+100 mM NaCl
	+300 mM NaCl
	+500 mM NaCl
	+ 1 % (w/v) Triton X-100
	+11,4 mM N-Octyl- β -D-Glucopyranosid
	+ 1 mM DTT

In den durchgeführten Dialysen war beim Start des Versuches überall die gleiche Proteinkonzentration (10 μ M) enthalten. Nach Beendigung der Dialyse (nach 5,5 h) wurden die Proben aus den Schläuchen genommen, die Proteinaggregate durch Zentrifugation entfernt und von den Überständen wurde die Proteinkonzentration durch einen Wellenlängen-Scan bestimmt. In sämtlichen Ansätzen präzipitierten die Proteine ohne größere quantitative Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Abb.3.14 zusammengefasst.

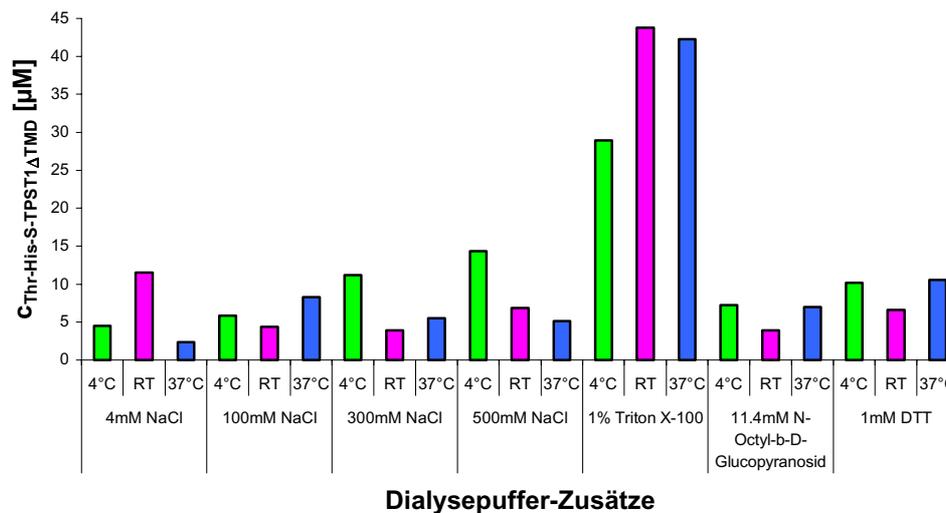


Abb.3.14 Bestimmung der Thx-*hTPST1ΔTMD*-Konzentration nach Dialyse gegen Puffer mit stabilisierenden Zusätzen. Affinitätsgereinigtes Thx-*hTPST1ΔTMD* (10 μM) wurde für 5,5 h in 20 mM Tris/HCl pH 6,7 mit in der Abbildung angegebenen Zusätzen bei 4 °C (grün), RT (pink) und bei 37 °C (blau) dialysiert. Aufgetragen wurde Thx-*hTPST1ΔTMD*-Proteinkonzentration nach Beendigung des Versuches.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach der Dialyse zeigt, dass die Temperatur keinen Einfluss auf den Präzipitationsgrad von Thx-*hTPST1ΔTMD* ausübt (Abb.3.14). Eine Erhöhung der Salzkonzentration bei 4 °C führt zu ansteigenden Proteinkonzentrationen (Abb.3.14). Die bestimmten Proteinkonzentrationen für die gegen Triton X-100-enthaltenden Puffer dialysierten Proteinlösungen entsprechen nicht der tatsächlichen Proteinmenge pro Volumen (Abb.3.14). Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Wellenlängen-Scans beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz und ist für wässrige Lösungen anwendbar. Da Triton X-100 die Absorption des Lösungsmittels beeinträchtigt, konnte diese Probe nicht zur Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen werden. Da der Präzipitationsgrad dieser Proben visuell vergleichbar mit dem der anderen Proben war, wurde davon ausgegangen, dass Triton X-100 ebenfalls keinen stabilisierenden Effekt auf Thx-*hTPST1ΔTMD* ausübt. N-Octyl-β-D-Glucopyranosid und DTT verhinderten die Aggregation von Thx-*hTPST1ΔTMD* ebenfalls nicht (Abb.3.14).

In einem zweiten Screen wurde der stabilisierende Effekt von Substrat und Substrat-Analoga auf die Zielproteine untersucht. Deshalb wurde der Dialyseversuch mit Thx-*hTPST1ΔTMD* im Zelllysate modifiziert (Abb.3.14). Dialysiert wurde die zytosolische

Protein-Fraktion gegen 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02% (w/v) Triton X-100 und je 50 μ M Zusätzen:

Tyrosin
 PAPS + Tyrosin
 PAP + Tyrosin
 AMP + Tyrosin
 AMP + K_2SO_4
 ADP + Tyrosin
 ATP + Tyrosin.

Die Proteinmenge, die eingesetzt wurde, war in allen Proben identisch. Die Dialyse wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. In sämtlichen Ansätzen waren nach Beendigung des Versuches präzipitierte Proteine sichtbar, die durch Zentrifugation entfernt wurden. Von den Überständen wurde das Volumen und die Proteinkonzentration (BRADFORD-Test; Bradford, 1976; Krüger, 1994) bestimmt (Abb.3.15). Zudem wurden die Überstände elektrophoretisch untersucht.

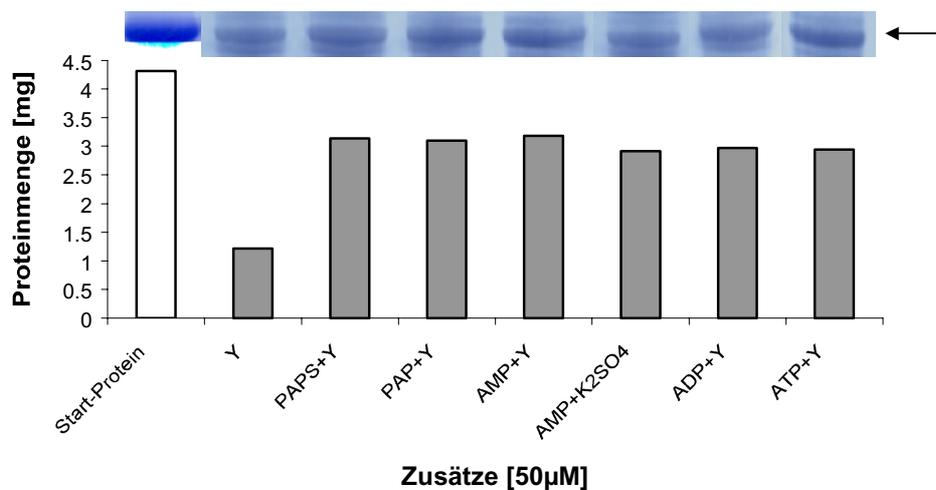


Abb.3.15 Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge einschließlich Thx-*h*TPST1 Δ TMD nach Dialyse gegen Substrate und Substratanaloga. Zelllysate (ca. 5 mg/ml Gesamtprotein) mit Thx-*h*TPST1 Δ TMD wurden über Nacht bei 4 °C gegen 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02% (w/v) Triton X-100 und je 50 μ M entsprechender Zusätze dialysiert. Die Präzipitate wurden pelletiert und der Gesamt-Proteingehalt bestimmt. Die Überstände wurden elektrophoretisch untersucht. Der Pfeil markiert Thx-*h*TPST1 Δ TMD. (Start-Protein: Protein-Gehalt vor der Dialyse, Y: Tyrosin, PAPS: Adenosin 3'-Phosphate 5'-Phosphosulfat, PAP: Adenosin 3', 5'-Diphosphate, AMP: Adenosin 5'-Monophosphat, ADP: Adenosin 5'-Diphosphat, ATP: Adenosin 5'-Triphosphat)

Die in der Abb.3.15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Proteinmenge sich in allen Proben verringert hatte. In dem gezeigten Ausschnitt des SDS-Polyacrylamid-Geles ist zu

erkennen, dass die Proteinbande, die Thx-*h*TPST1 Δ TMD darstellt (Pfeil, Abb.3.15), ebenfalls verringert ist. Der Hauptteil des während der Dialyse gebildeten Präzipitats ist demnach wahrscheinlich Thx-*h*TPST1 Δ TMD.

Um die Ursache für die Aggregation von Thx-*h*TPST1 Δ TMD in neutralen Puffersystemen zu ermitteln, wurde ein dritter Dialyse-Screen durchgeführt. Dabei wurden die Thx-*h*TPST1 Δ TMD-enhaltenen Zelllysate gegen Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten dialysiert. Der Dialysepuffer bestand aus: 50 mM Tris/HCl bzw. 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02% (w/v) Triton X-100. Die untersuchten pH-Werte waren: 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0. In jedem Dialyseansatz wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt. Nach 40 h wurden die Präzipitate pelletiert. Von den Überständen wurde das Volumen und die Proteinkonzentration (BRADFORD-Test; Bradford, 1976; Krüger, 1994) bestimmt und es erfolgte eine elektrophoretische Analyse der Proteine. Der Gesamt-Proteingehalt nach den Dialysen ist in Abb. 3.16 dargestellt.

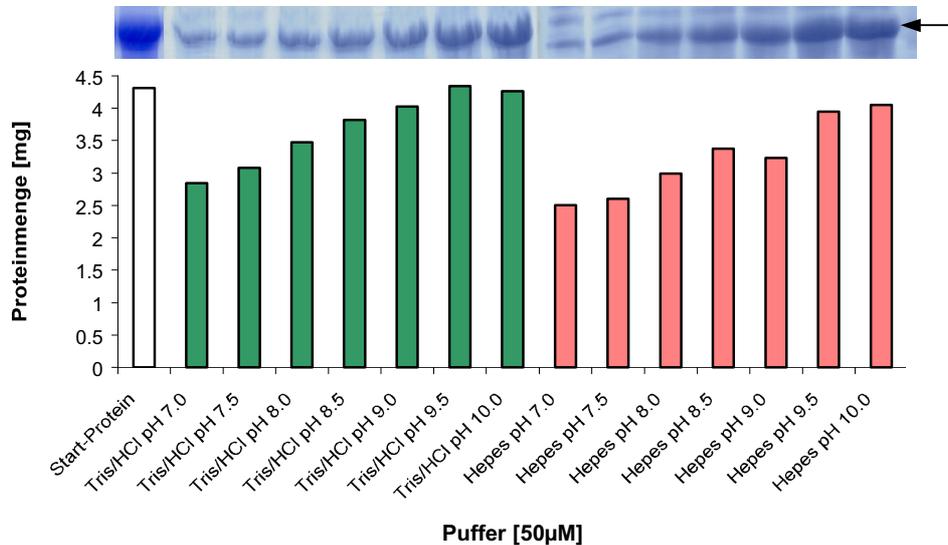


Abb.3.16 Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge nach Dialyse von Thx-*h*TPST1 Δ TMD-enhaltenen Gesamt-Zelllysaten gegen unterschiedliche Puffer bei verschiedenen pH-Werten. Die zytosolische Fraktion der Zelllysate (pH 11, ca. 5 mg/ml Gesamtprotein) mit Thx-*h*TPST1 Δ TMD wurde für 40 h bei 4 °C gegen 50 mM Tris/HCl (grün) bzw. 50 mM Hepes (rot), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02% (w/v) Triton X-100 unterschiedliche pH-Werte dialysiert. Die Präzipitate wurden pelletiert und der Gesamt-Proteingehalt bestimmt. Die Überstände wurden elektrophoretisch untersucht.

Die nach den Dialysen bestimmten Proteinmengen der löslichen Fraktion zeigten eine Abhängigkeit vom pH-Wert der Dialysepuffer (Abb.3.16). Ein Unterschied zwischen der Verwendung von Tris/HCl-Puffer und HEPES-Puffer wurde nicht festgestellt (Abb.3.16). Die Analyse der löslichen Proteinfraktion durch SDS-PAGE ergab eine Verringerung der Thx-*h*TPST1 Δ TMD-Proteinmenge (Pfeil, Abb.3.16).

Aus den Abbildungen 3.14 bis 3.16 ist ersichtlich, dass die Aggregation von Thx-*h*TPST1 Δ TMD unter den untersuchten Bedingungen ausser von der Salzkonzentration bei 4 °C nur vom pH-Wert abhängig ist. Wird gegen einen pH < 8,5 dialysiert, so fallen die meisten Proteine innerhalb von 2,5 h aus (nicht gezeigt). Der pK_a-Wert der SH-Gruppe im freien Cystein beträgt 8,3. Cystein ist demnach die einzige Aminosäure, deren Löslichkeitsverhalten innerhalb dieses pH-Bereiches prinzipiell beeinflusst werden kann. Allerdings muss beachtet werden, dass die pK_a-Werte in Proteinen stark von denen der freien Aminosäuren abweichen können. Ob die sehr schnelle Aggregation der *h*TPSTs unterhalb von pH 8,5 auf falsch-gebildete Disulfidbrücken zurückzuführen ist, muss demnach noch nachgewiesen werden.

Um den Einfluss der Disulfidbrücken-Bildung auf die Aggregation von Thx-*h*TPST1 Δ TMD zu bestätigen, wurden die Präzipitate, die in den durchgeführten Dialyse-Screens entstanden waren (Abb.3.14 bis 3.16), mit 50 mM β -Mercaptoethanol behandelt. Nach Inkubation (mindestens 30 min, RT) erfolgte eine teilweise Auflösung der Präzipitate (nicht gezeigt). Wird Thx-*h*TPST1 Δ TMD nicht-reduzierend durch SDS-PAGE analysiert, so kann kein Monomer (Molekulargewicht von 56813 Da) des Proteins detektiert werden (Spur- in Abb.3.17).

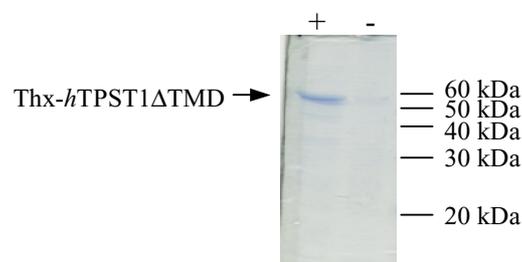


Abb.3.17 SDS-PAGE-Analyse von Thx-*h*TPST1 Δ TMD unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Reduzierende (+) und nicht-reduzierende (-) SDS-PAGE von je 50 pmol Thx-*h*TPST1 Δ TMD nach Reinigung an Ni-NTA.

Erfolgt die Auftrennung der Proteinprobe unter reduzierenden Bedingungen, so kann mit Coomassie ein Thx-*h*TPST1 Δ TMD-Monomer detektiert werden (Spur + in Abb.3.17). Dieses Monomer wurde bisher noch nicht im TPST-Enzymaktivitätsassay auf Sulfatierungsaktivität untersucht.

Dieses Ergebnis läßt auf die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken der 6 in *h*TPST1 Δ TMD-verbleibenden Cysteyl-Reste schließen, die zur Aggregation der Proteine führen. Deshalb wurden in den nächsten Versuchen die Proteine gereinigt, unter reduzierenden Bedingungen komplett entfaltet und anschließend in geeigneten Puffern rückgefaltet.

3.6.3 Rückfaltung von denaturiertem *h*TPST1 Δ TMD und Thx-*h*TPST1 Δ TMD

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die *h*TPSTs nach der Expression in *E. coli* innerhalb der Zellen unlösliche Aggregate, sogenannte Inclusion Bodies bilden. Die Inclusion Body-Bildung konnte nicht durch die Expression eines geeigneten Konstruktes, nicht durch bestimmte Expressionsbedingungen und nicht durch bestimmte Puffer verhindert werden (3.6.1, 3.6.2). Deshalb wurde nun versucht, die Inclusion Bodies zu reinigen, die erhaltenen Proteine vollständig zu entfalten und die *h*TPSTs unter geeigneten Bedingungen korrekt zurückzufalten.

Die Inclusion Bodies wurden durch Zentrifugation nach Zellaufschluss isoliert und anschließend mehrfach gewaschen (2.2.4.5). Anhand von analytischen SDS-Polyacrylamid-Gelen konnte abgeschätzt werden, dass die in den Inclusion Bodies enthaltene Protein-Lösung zu 90% aus dem Zielprotein besteht (nicht gezeigt). Die Denaturierung der Proteine erfolgte über Nacht in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 6 M Guanidinium HCl, 300 mM DTT, 1 mM EDTA bei 8 °C (2.2.4.6). Zu Beginn der Versuchsreihe wurden unterschiedliche Puffer für die Rückfaltung getestet:

Polyacrylamid-Gele, dass durch den Zusatz von 1 M Arginin im Rückfaltepuffer die Löslichkeit von *hTPST1ΔTMD* und *Thx-hTPST1ΔTMD* erhöht werden konnte. Die unter diesen Bedingungen zurückgefalteten Proteine konnten allerdings nicht aufkonzentriert werden (max. 15 μM).

Um die Ausbeuten korrekt rückgefalteter Proteine zu erhöhen, wurde ausgehend von dieser Versuchsreihe Tris-Puffer pH 9,0 und 1 M Arginin in weiteren Rückfalte-Ansätzen verwendet. Außerdem wurde der Einfluss weiterer Zusätze im Rückfalte-Puffer und im Dialyse-Puffer untersucht (Tab.4). Die denaturierten Proteine (*hTPST1ΔTMD* und *Thx-hTPST1ΔTMD*) sollten sich in dem angegebenen Rückfaltepuffer durch schnelle Verdünnung und anschließender Inkubation bei 10 °C für 6 h falten. Gegebenfalls wurde die Proteinlösung durch Dialyse von den Rückfalte-Substanzen befreit. Die löslichen Proteinbestandteile am Ende der in Tab.4 angegebenen Prozedur wurden analysiert.

Tab.4 Rückfalte- und Dialyseansätze von *hTPST1ΔTMD* und *Thx-hTPST1ΔTMD*

	Rückfaltepuffer	Dialysepuffer	Analyse
a	0,1 M Tris/HCl pH 9,0, 0,5 mM MnCl ₂ , 5 mM GSSG, 1 M Arginin	• 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 0,5 mM MnCl ₂	Aggregation (SDS-PAGE)
b	0,1 M Tris/HCl pH 9,0, 0,5 mM MnCl ₂ , 5 mM GSSG, 1 M Arginin, 1,5 Äquivalente ADP, 3 Äquivalente Na ₂ SO ₄	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 • 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 100 mM Na₂SO₄ • 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 0,5 mM MnCl₂ • 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 0,5 mM MnCl₂, 20% (w/v) Glycerol 	<ul style="list-style-type: none"> • Aggregation (SDS-PAGE) • Aggregation (SDS-PAGE) • Aggregation (SDS-PAGE) • Aggregation (SDS-PAGE)
c	0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,5 mM MgCl ₂ , 5 mM GSSG, 1 M Arginin, 1,5 Äquivalente ADP, 3 Äquivalente Na ₂ SO ₄		Aggregation (Fluoreszenz, Light Scattering)
d	0,1 M Tris/HCl pH 9,0, 0,5 mM MnCl ₂ , 5 mM GSSG, 1 M Arginin, 1,5 Äquivalente ADP, 3 Äquivalente Na ₂ SO ₄ , 2% (v/v) Tetraethylenglykol monoethylether (C ₈ E ₄), 50 mM NaF		Aggregation (Fluoreszenz, Light Scattering)
e	0,02 M Tris/HCl pH 7,0, 5 mM GSSG, 0,5 mM MgCl ₂ , 3,2 μM DnaK _{Tth} , 0,8 μM DnaJ _{Tth} , 0,4 μM GrpE _{Tth} , 0,5 μM ClpB _{Tth}		Aggregation (Fluoreszenz, Light Scattering)

Die in der Tabelle 4 aufgeführten Experimente wurden sowohl mit *hTPST1ΔTMD* als auch mit *Thx-hTPST1ΔTMD* durchgeführt. Nach Entfaltung wurden die Proteine in Puffern mit unterschiedlichen Zusätzen, die bei der Faltung der *hTPSTs* einen stabilisierenden Einfluss haben sollten, rückgefaltet. Dazu zählen (wie in den Versuchen in Abschnitt 3.6.2) unterschiedliche pH-Werte und Substrat-Analoga. Außerdem wurden Substanzen zum Solubilisieren von Membranproteinen und Chaperone während der Rückfaltung eingesetzt. In einem Teil der Experimente konnte die Aggregation sofort durch Fluoreszenz-Messungen und durch Light Scattering-Messungen nachgewiesen werden (Tab.4). Bei den anderen Messungen wurden die Proteine gegen Puffer mit einem pH-Wert in der Nähe des pH-Optimums der aktiven *hTPSTs* dialysiert. Die verwendeten Dialysepuffer enthielten teilweise ebenfalls Substrat-Analoga, für die Aktivität essentielle Ionen oder Glycerol zum Stabilisieren der Proteine. Durch SDS-PAGE konnte die Aggregation der Proteine sichtbar gemacht werden (Tab.4). In keinem der mit diesen Proben durchgeführten TPST-Enzymaktivitätstests konnte Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Mit den in dieser Arbeit gewählten Puffern konnten keine *hTPSTs* aus denaturierten Proteinen rückgefaltet werden. Dass zumindest *Thx-hTPST1ΔTMD* ein stabiles und korrekt gefaltetes Protein bilden kann, wurde bereits im Abschnitt 3.4 gezeigt. Die TPSTs sind *in vivo* Glykoproteine (Niehrs *et al.*, 1990a). Es wird angenommen, dass diese Zuckerketten zur Stabilisierung der Proteine beitragen. Deshalb wurde die Expression der *hTPSTΔTMDs* in Zellsystemen, die im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage sind, Proteine zu glykosilieren, fortgesetzt. Als Expressionssysteme wurden Insekten-Zellen (3.7) und Hefe-Zellen (3.8) verwendet.

3.7 Expression von *hTPST1ΔTMD* in Sf21-Zellen

Insektenzellen glykosilieren gebildete Proteine, was zu deren Stabilisierung führen kann. *hTPST1* enthält zwei potentielle Glykosylierungsstellen in dem Konstrukt *hTPST1ΔTMD*. Aus diesen Gründen sollte die Expression aktiven *hTPST1ΔTMDs* in Insektenzellen Sf21 versucht werden.

Im ersten Schritt wurde ausgehend von pBlueScriptII KS(+) *hTPST1* durch PCR (2.2.1.1) mit TPST1-Sf01s und TPST1-02a als Primerpaar (Tab.1 in Abschnitt 2.1.2) ein Fragment hergestellt, das in pBlueBacHis2 A kloniert werden konnte (2.2.1.6). Der so entstandene pBlueBacHis2 A *hTPST1ΔTMD*-Vektor wurde mit der linearisierten Viren-DNA Bac-N-Blue™ und dem Transfektionsreagenz CellFECTIN® gemischt. CellFECTIN® ist ein kationisches Lipid, das den Eintritt der DNA in die Insektenzelle vermittelt. Dabei kommt es während der Transfektion zu einer homologen Rekombination, bei der das vom Virus nicht benötigte Polyhedrin-Gen gegen die Fremd-DNA und einen Teil des β-Galaktosidase-Gens ausgetauscht wird. Die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* wird dadurch nach der Rekombination durch den sehr starken Polyhedrin-Promotor kontrolliert. Mit dem oben beschriebenen Mix wurden logarithmisch wachsende Sf21-Zellen transfiziert (2.2.5.1). Die bei diesen Transfektionsansätzen gewonnene Viruslösung konnte zur Reinigung des rekombinanten Baculovirus verwendet werden (2.2.5.2). Der letztendlich erhaltene Virustiter betrug $4,4 \times 10^7$ pfu/ml (2.2.5.6). Zur Überprüfung der Insertion von *hTPST1ΔTMD* in das Viren-Genom wurde aus 200 µl dieser hochkonzentrierten Viruslösung die virale DNA isoliert und mittels PCR analysiert (2.2.5.4; Abb.3.19)

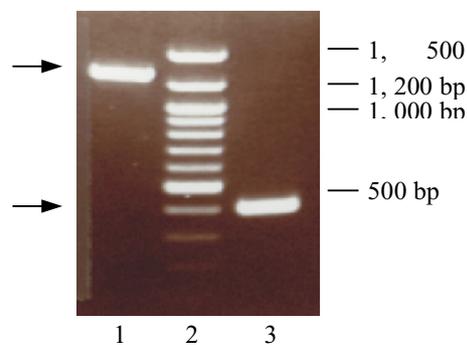


Abb.3.19 Agarose-Gel zum Nachweis der *hTPST1ΔTMD*-Insertion in das Genom von Bac-N-Blue-Viren-DNA. Aus 200 µl einer Viruslösung ($4,4 \times 10^7$ pfu/ml) wurde die DNA isoliert und PCR-Analysen unterzogen. Die Auftrennung erfolgte im 1%-igen Agarose-Gel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid. Die Pfeile markieren die theoretischen Fragment-Größen nach PCR bei erfolgter Rekombination von *hTPST1ΔTMD* in das Viren-Genom. (Spur 1, PCR mit Baculoforward und Baculoreverse Primern; Spur 2, 100 bp DNA Leiter (Invitrogen GmbH, Karlsruhe); Spur 3, PCR mit TPST1kurzs und TPST1kurzas Primern)

Das Agarose-Gel in Abb.3.19 zeigt das amplifizierte Fragment, das nach PCR mit den Virus-spezifischen Primern (Baculoforward und Baculoreverse) erhalten wurde (Spur1

Abb.3.19) Die Größe des amplifizierten Fragments stimmt mit der erwarteten Größe nach Insertion von *hTPST1ΔTMD* in das Viren-Genom überein (1274 bp). Mit *hTPST1*-spezifischen Primern (TPST1kurzs und TPST1kurzas) konnte ein Fragment amplifiziert werden, dessen Größe ebenfalls der theoretischen Größe entsprach (405 bp; Spur 3 Abb.3.19). Mit diesem Versuch ist eindeutig nachgewiesen, dass die in der Lösung enthaltenen Viren die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* in ihr Genom inseriert haben. Das ist die Grundvoraussetzung für die Expression von *hTPST1ΔTMD* in Sf21-Zellen nach Transfektion der Zellen mit dem Virus.

Mit der *hTPST1ΔTMD*-enthaltenden Viruslösung wurden 300 ml einer Sf21-Kultur ($1,2 \times 10^6$ Zellen/ml) mit einer MOI = 10 transfiziert und für 99 h inkubiert (2.2.5.7). Zweimal täglich wurde 1 ml von der Expressionskultur abgenommen. Die Zellen wurden pelletiert und das Medium wurde mit Hilfe von TCA zehnfach aufkonzentriert (2.2.2.3). Die Analyse der Expression von *hTPST1ΔTMD*-His₆ erfolgte im Western-Blot-Verfahren mit anti-His-Antikörpern (Abb.3.20A, linkes Bild mit Medium-Proben, rechtes Bild mit Zelllysaten). Eine zweite Expression wurde nach 30 h beendet, die Zellen wurden aufgeschlossen und die His-reichen Proteine des daraus resultierenden Zelllysates über die Ni-NTA aufkonzentriert (2.2.2.5). Die Analyse der Protein-Konzentration erfolgte durch SDS-PAGE (rechtes Bild der Abb.3.20B) und Western-Blot-Verfahren (linkes Bild der Abb. 3.20B).

wurde. Für die Analyse der zweiten Testexpression (Abb.3.20B) wurde der anti-PentaHis-Antikörper zur Detektion His-reicher Proteine verwendet (Abb.3.20B linkes Bild). Der in diesem Teilversuch verwendete Antikörper weist wesentlich geringere Kreuzspezifitäten als das in Teil A der Abbildung verwendete Konjugat auf. Im rechten Teil der Abb.3.20B ist die Analyse der Proteinlösungen im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel gezeigt. In dieser nur 30 h dauernden Expression konnte ebenfalls kein neu exprimiertes Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden (Abb.3.20B). Auch nach der Aufkonzentrierung der His-reichen Proteine an Ni-NTA konnte das Zielprotein weder im SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht werden, noch im Western-Blot mit den anti-His-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb.3.20B). Der anti-*hTPST1*-Antikörper konnte ebenfalls kein *hTPST1ΔTMD*-His in den Expressionskulturen detektieren (nicht gezeigt). Im TPST-Enzymaktivitätstest wurde keine Aktivität gemessen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *hTPST1ΔTMD* in den Insektenzellen Sf21 nicht exprimiert wurde. Zur Expression von Proteinen stehen noch weitere eukaryotische Systeme zur Verfügung. Als nächstes sollte deshalb die Expression der *hTPSTs* in Hefezellen durchgeführt werden.

3.8 Expression von *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in *P. pastoris* X-33-Zellen

Die Expression von löslichen und aktiven *hTPSTs* in *E. coli* gelang nicht, da die Proteine in den Zellen als Inclusion Bodies vorlagen und nicht korrekt zurückgefaltet werden konnten. In Sf21-Zellen wurden die Proteine nicht exprimiert. Ein weiteres Expressionssystem stellen Hefe-Zellen (*Pichia pastoris*) dar. In diesem System können ebenfalls Proteine exprimiert und ggf. sezerniert werden, wodurch die Aufreinigung erleichtert werden kann. *P. pastoris* Zellen sind wie die Insektenzellen in der Lage, die heterolog exprimierten Proteine zu glykosilieren, führen aber keine Hyperglykosylierung wie *Saccharomyces cerevisiae* durch.

3.8.1 Klonierung von X-33 *hTPST1ΔTMD* und X-33 *hTPST2ΔTMD*-Konstrukten

Zunächst wurden die Gensequenzen für *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in den entsprechenden Vektor, in diesem Fall pPICZαB (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kloniert.

Der Vektor kodiert für ein α -Sekretionssignal am N-Terminus und für ein myc-Epitop und $6 \times$ His-Reste am C-Terminus des Zielproteins. Unter Verwendung der Primerpaare pichia-01s und pichia-02a für *hTPST1* Δ TMD bzw. pichia-03s und pichia-04a für *hTPST2* Δ TMD (Tab.1 im Abschnitt 2.1.2) wurden die entsprechenden Genfragmente ausgehend von pBlueScriptII KS(+) *hTPST1* bzw. pBlueScriptII KS(+) *hTPST2* amplifiziert (2.2.1.1) und in die Schnittstellen von Pst I und Xba I des Vektors kloniert (2.2.1.6). Die Amplifikation des Vektors erfolgte in *E. coli* XL10-Gold. Zur Überprüfung der Sequenz wurden 5[?]AOX1-Pichia-long bzw. 3[?]AOX1-Pichia-long verwendet (2.2.1.5).

Auch in diesem Expressionssystem wird während der Transformation die genetische Information der klonierten Fragmente einschließlich der verwendeten Antibiotika-Resistenz in das Genom der Zellen integriert. Dabei werden stabile Transformanten durch homologe Rekombination zwischen der zu transformierenden, linearisierten Vektor-DNA und homologen Regionen innerhalb des Hefe-Genoms generiert. Diese Gen-Insertion erfolgt am *AOX1*-Locus (Alkohol-Oxidase) durch einen einzelnen „cross-over“ Vorgang zwischen dem genetischen Locus des *AOX1*-Promotors und dem *AOX1*-Transkriptions-Terminator des Vektors. Dadurch werden eine oder seltener mehrere Kopien des Vektors oberhalb oder unterhalb des *AOX1*-Genes inseriert. Das einklonierte Gen steht damit unter der Kontrolle des *AOX1*-Promotors. Die Aktivierung des *AOX1*-Promotors erfolgt durch Methanol. Dadurch kann die Expression des einklonierten Proteins durch Gabe von Methanol ins Medium induziert werden.

Zur Vorbereitung auf die Insertion wurden 10 μ g pPICZ α B *hTPST1* Δ TMD, 6,5 μ g pPICZ α B *hTPST2* Δ TMD und 10 μ g pPICZ α B mit Pme I linearisiert (2.2.1.4) und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (2.2.1.2). Die Transformation der linearisierten Vektoren in die *P. pastoris* X-33 erfolgte zur besseren Ausbeute durch Elektroporation (2.2.5.1). Auf selektiven Agarplatten (Antibiotika-Resistenz) erhaltene Transformanten wurden auf Insertionen durch PCR-Analysen überprüft (Abb.3.21).

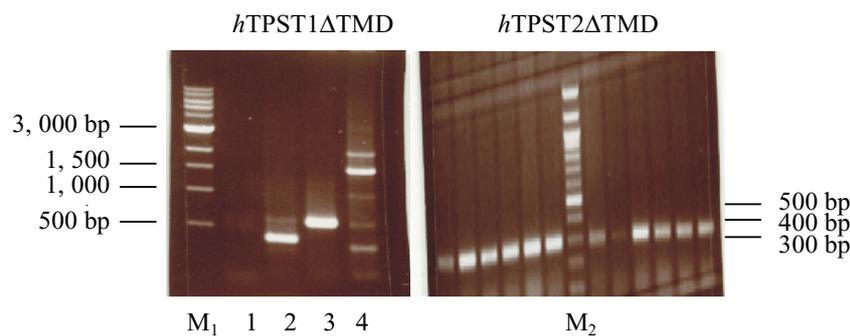


Abb.3.21 Agarose-Gel zum Nachweis von *hTPST1*- und *hTPST2*-Sequenzen im X-33-Genom. Je eine Kolonie X-33-Zellen mit leerem Vektor, *hTPST1ΔTMD* oder *hTPST2ΔTMD* transformiert, wurden durch Lyticase (25 U; 10 min 30 °C, 30 min 80 °C) aufgeschlossen und in PCRs als Template eingesetzt. X-33 pPICZαB und X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* wurden mit TPST1kurzs/TPST1kurzas Primern und mit 5[?]AOX1-Pichia-long/3[?]AOX1-Pichia-long Primern amplifiziert; X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* mit TPST2kurzs/TPST2kurzas Primern (12 unterschiedliche Klone). Die Auftrennung erfolgte im 1%-igen Agarose-Gel mit 0,2 μg/ml Ethidiumbromid. (1, X-33 pPICZαB mit TPST1kurzs/TPST1kurzas Primern; 2, X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* mit TPST1kurzs/TPST1kurzas Primern; 3, X-33 pPICZαB mit 5[?]AOX1-Pichia-long/3[?]AOX1-Pichia-long Primern; 4, X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* mit 5[?]AOX1-Pichia-long/3[?]AOX1-Pichia-long Primern; M₁, 1 kb Standard; M₂, 100 bp Standard)

Abb.3.21 zeigt im Agarose-Gel die PCR-Produkte zur Überprüfung der Insertion von *hTPST1ΔTMD* (linkes Bild) bzw. *hTPST2ΔTMD* (rechtes Bild) in das Genom von X-33-Zellen. In die Kontrollzellen sollte lediglich ein Teil des leeren Vektors transformiert werden. Eine PCR mit *hTPST1*-spezifischen Primern ergab folglich kein Fragment (Spur 1). Mit einem *P. pastoris*-spezifischen Primerpaar wurde ein Fragment amplifiziert, dass der Größe des ins Genom integrierten leeren Vektor-Fragmentes entspricht (592 bp; Spur 3). Nach Integration von *hTPST1ΔTMD* ins Genom von X-33 erhält man nach PCR mit *hTPST1*-spezifischen Primern ein Fragment mit der erwarteten Größe von 405 bp (Spur 2) und mit *P. pastoris*-spezifischen Primern ein Fragment mit der erwarteten Größe von 1566 bp (Spur 4). Die Amplifikation einiger Nebenfragmente, wie sie in Spur 4 zu sehen sind, beeinträchtigt die Auswertung nicht. Nach der genomischen Insertion von *hTPST2ΔTMD* in X-33 wurden 12 Transformanten durch PCR-Analyse überprüft (rechtes Gel). Aus allen 12 Klonen konnte mit *hTPST2*-spezifischen Primern ein Fragment der erwarteten Größe (305 bp) amplifiziert werden.

Diese Analyse zeigte, dass durch die Transformation X-33-Zellen zur Verfügung standen, die die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* bzw. *hTPST2ΔTMD* in das Genom integriert hatten und dass diese Integration an der dafür vorgesehenen Stelle erfolgt war. Zusätzlich wurde ein Kontroll-Klon hergestellt, bei dessen Transformation Teile des

leeren Vektors (ohne Insertion) verwendet wurde. Im Weiteren wurde dieser Kontroll-Klon parallel zu den *hTPSTΔTMD*-enthaltenen Klonen behandelt.

3.8.2 Bestimmung des Mut-Phänotypes

Der Mut-Phänotyp bezieht sich auf die Fähigkeit eines bestimmten *P. pastoris*-Klones, mit Methanol als einzigste Kohlenstoff-Quelle zu leben. Zur Umsetzung von Methanol wird die Alkohol-Oxidase exprimiert. Der dazugehörige Gen-Locus ist das *AOX*-Gen. In *P. pastoris* existieren zwei Kopien dieses Gens, von denen das *AOX1*-Gen wesentlich stärker exprimiert wird. Erfolgt ein Verlust des *AOX1*-Gens, z. B. durch Insertion von Fremd-DNA, so wachsen die Zellen langsamer auf Methanol-enthaltendem Medium. Sie werden als Mut^s-phänotypisch bezeichnet (Methanol utilization slow). Mut⁺ bezieht sich auf die Fähigkeit des Wildtyps (*AOX1*-Gen intakt) mit Methanol gut zu leben (Methanol utilization plus). Die Ausprägung des Mut-Phänotypes ist demnach von dem genauen Ort der genetischen Insertion während der Transformation abhängig. Er hat Auswirkungen auf die Expressions-Induktion und muss deshalb vorher bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Mut-Phänotypes wurden die *hTPST*-enthaltenen Klone auf MM- (Minimalmedium mit Methanol als einzige Kohlenstoff-Quelle) und MD- (Minimalmedium ohne Methanol, mit Glukose) Agarplatten übertragen. Nach 2 d Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Klone auf den beiden Medien verglichen (Abb.3.22).

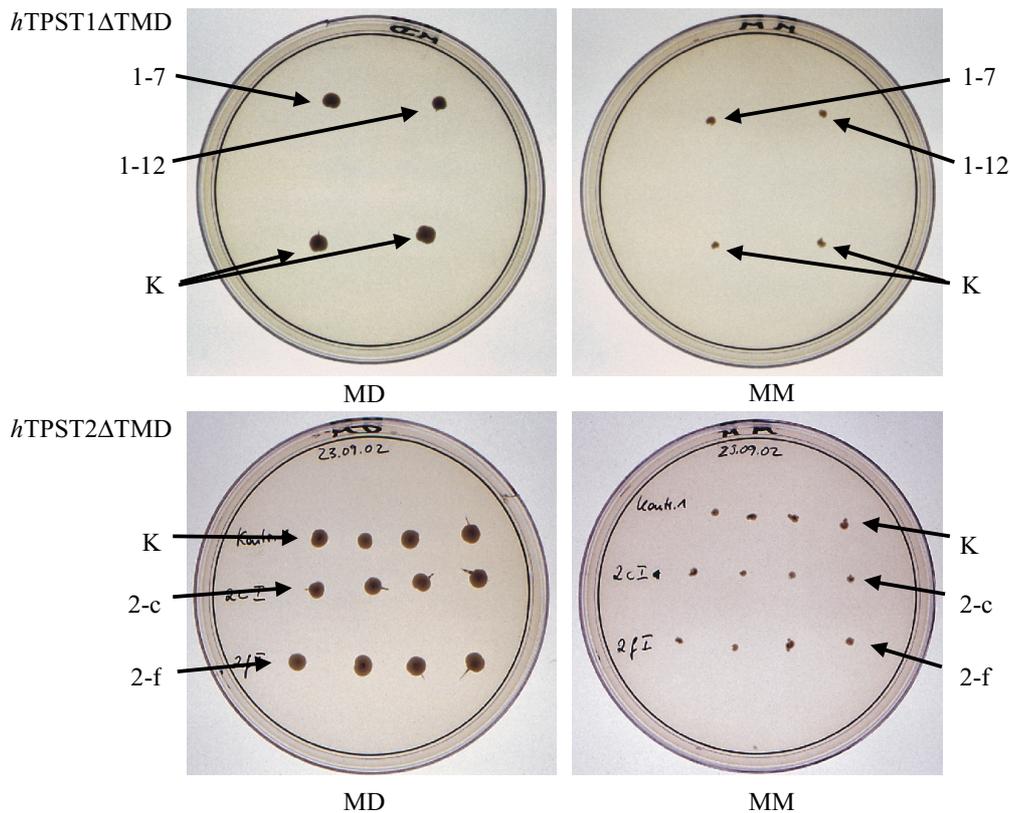


Abb.3.22 Bestimmung des Mut-Phänotypes von X-33 pPICZαB-, X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD*- und X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD*-Klonen. Die Zellen wurden auf MD (Minimalmedium ohne Kohlenstoff, mit Dextrose) und MM (Minimalmedium mit Methanol) Agarplatten überimpft und für 2 d bei 30 °C inkubiert. (K, X-33 pPICZαB; 1-7, 1-12, X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD*; 2-c, 2-f, X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD*)

Die Abb.3.22 zeigt das Wachstum der X-33-Klone auf den MD-Platten (Minimalmedium ohne Kohlenstoff, mit Dextrose; linke Bilder) und den MM-Platten (Minimalmedium mit Methanol; rechte Bilder). Auf beiden Platten-Typen wurden 2 X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD*-Klone (1-7, 1-12; obere Bilder), insgesamt 8 Klone X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* (4× 2-c, 4× 2-f; untere Bilder) und insgesamt 6 Kontroll-Klone (X-33 pPICZαB; K, obere und untere Bilder) analysiert. Alle untersuchten Klone zeigten auf MM-Platten ein verringertes Wachstum, das einem Mut^s-Phänotyp entspricht (Methanol ut^silization glow). Das ist insofern ungewöhnlich, alsdass X-33-Zellen in den meisten Fällen Mut⁺ sein sollten. In diesem Fall scheinen nur die Zellen die Selektion auf Antibiotika überlebt zu haben, bei denen die eher seltenere Insertion in die 5'-*AOXI*-Region erfolgte.

Dieses Experiment bildete die Grundlage für die Auswahl der Expressionsstrategie von *hTPST1ΔTMD* (Abschnitt 3.8.3.1) und *hTPST2ΔTMD* (3.8.3.2), die in den folgenden Kapiteln dargestellt wird.

3.8.3 Expression von *hTPSTΔTMDs* in X-33 und ihre Reinigung

3.8.3.1 Expression und Reinigung von *hTPST1ΔTMD*

Da der in Abschnitt 3.8.2 bestimmte Phänotyp für die X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* Klone 1-7 und 1-12 Mut^s war, erfolgte die Expression von *hTPST1ΔTMD* nach einem Protokoll für Zellen mit Mut^s-Phänotyp (2.2.6.4). Dazu wurden Übernachtskulturen von X-33 pPICZαB und X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* Klone 1-7 und 1-12 auf 1/6-tel Volumen in BMGY-Medium konzentriert und für 6 d bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Induktion der Expression wurde alle 24 h 0,5% Methanol zugegeben. Für die Überprüfung der Expression wurde nach 3 und 6 Tagen je 1 ml Kultur abgenommen und zentrifugiert. Das Medium wurde durch TCA-Fällung (2.2.2.3) zehnfach konzentriert und die Zellen wurden in 1/10-tel Volumen Breaking-Puffer mit Hilfe von Glaskugeln aufgebrochen (2.2.6.5). Nach Beendigung der Expression wurden die Kulturen geerntet und bei -80 °C gelagert. Die Ergebnisse der Expression von *hTPST1ΔTMD*-cMyc-His₆ sind in Abb.3.23 dargestellt.

hTPST1ΔTMD-cMyc-His₆ Zucker-Reste gebunden sein, können pro Glykosylierungsstelle bis zu 30 D-Mannose-Reste gebunden sein. Das entspricht einem zusätzlichen Molekulargewicht von 4,86 kDa. Da *hTPST1ΔTMD-cMyc-His₆* zwei Glykosylierungsstellen besitzt, beträgt das Molekulargewicht des gebildeten *hTPST1ΔTMD* demnach zwischen 51686 Da und 61406 Da. Wird das Protein sezerniert, so ist mit einer Abspaltung des Sekretionssignals, dem α -Faktor zu rechnen. Das im Medium zu erwartende Protein hätte dann allerdings ein Molekulargewicht zwischen 42747 Da und 52467 Da.

Abb.3.23 zeigt, dass in den beiden Klonen 1-7 und 1-12 *hTPST1ΔTMD-cMyc-His₆* exprimiert wurde. Die gebildeten Proteine sind trotz α -Sekretionssignal intrazellulär und enthalten wahrscheinlich Zucker-Reste. Dies kann aus dem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa abgeleitet werden.

Die Reinigung von *hTPST1ΔTMD* aus den X-33-Zellen erfolgte durch Ni-Chelat-Chromatografie. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe von Glaskugeln in Breaking-Puffer aufgeschlossen. Große Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und lösliche Proteine mit dem 1,5-fachen Volumen niedrig-Imidazol-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl) verdünnt. Aus diesem Proteingemisch wurden die an Ni-NTA bindenden Proteine angereichert. Die Reinigung ist für Klon 1-7 gezeigt (Abb3.24).

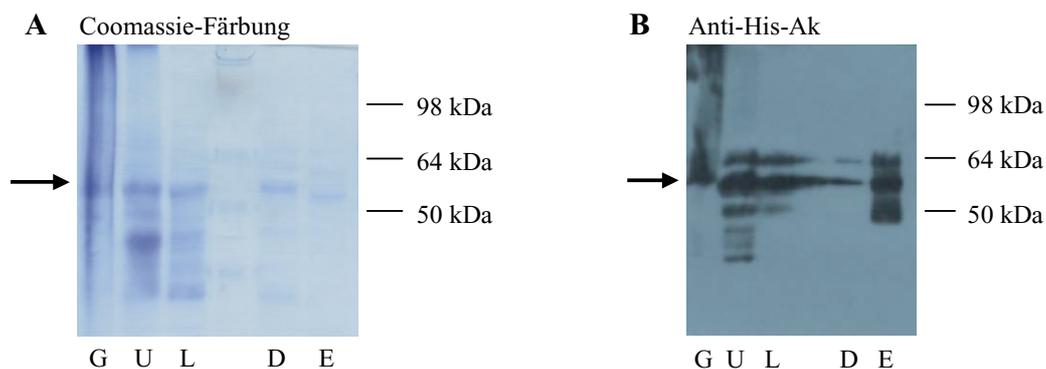


Abb.3.24 SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse der Reinigung von *hTPST1ΔTMD* Klon 1-7 aus X-33. Die Hefe-Zellen wurden in Breaking-Puffer mit Hilfe von Glaskugeln aufgeschlossen und die löslichen Ni-NTA-bindenden Proteine konzentriert. Die Auftrennung der Proteinlösungen erfolgte im 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Das Gel wurde entweder Coomassie gefärbt (**A**) oder die Proteine wurden durch Elektrotransfer auf PVDF-Membran überführt und mit einem anti-His-Antikörper (1:200; Dianova, Hamburg) detektiert (**B**). Die Pfeile markieren das erwartete Molekulargewicht von *hTPST1ΔTMD-cMyc-His₆*. (G, Gesamt-Zellaufschluss; U, unlösliche Proteine; L, lösliche Proteine; D, an Ni-NTA nicht gebundene Proteine; E, Konzentrat von Proteinen, die an Ni-NTA angereichert wurden)

In Abb.3.24A sind die bei der Reinigung von *hTPST1ΔTMD*-cMyc-His₆ erhaltenen Proteinfractionen nach SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt. Es konnte dabei kein Protein detektiert werden, das ein dem *hTPST1ΔTMD*-cMyc-His₆-entsprechendes apparentes Molekulargewicht (55 kDa) aufweist. In Teil B der Abb.3.24 sind die gleichen Proteinfractionen im Western-Blot analysiert. Der verwendete anti-His-Antikörper detektierte Proteine, die *hTPST1ΔTMD*-cMyc-His₆ entsprechen. Es ist zu erkennen, dass ein Teil der vom Antikörper erkannten *hTPST1ΔTMD*-cMyc-His₆-Proteine aus Klon 1-7 löslich ist und an die Ni-NTA-Matrix gebunden werden konnte. Dadurch gelang eine Anreicherung der Proteine. Weiterhin zeigt der Western-Blot in Abb.3.24B aufgrund seines Banden-Musters, dass schon direkt im Zellaufschluss die Proteine abgebaut werden. Um intrazelluläre Proteasen zu hemmen, wurden deshalb in folgenden Aufreinigungen Protease-Inhibitoren zugegeben. Außerdem wurde konstant bei 4 °C gearbeitet.

Mit der Kontrolle (X-33 pPICZαB) und mit Klon 1-12 (X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* Klon 1-12) wurde das gleiche Verfahren wie mit Klon 1-7 (X-33 pPICZαB *hTPST1ΔTMD* Klon 1-7) durchgeführt. Die Proben wurden bei 8 °C gelagert und anschließend im Sulfatierungsansatz auf Aktivität (2.2.2.9) untersucht. Bei diesem Assay soll die radioaktiv markierte Sulfat-Gruppe des [³⁵S]-PAPS an TPST binden und dann von dem Enzym auf Tyr63 des Substratmoleküls His-Hirudin übertragen werden. Die radioaktiven Ansätze wurden deshalb auf zwei verschiedenen Wegen untersucht. Zum einen konnte im Scintillationsmessgerät die Bindung von PAPS an TPST analysiert werden, zum anderen wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Trocknen des Gels auf einem Molecular Imager[®] auf das Vorhandensein von radioaktivem Hirudin getestet (Abb.3.25).

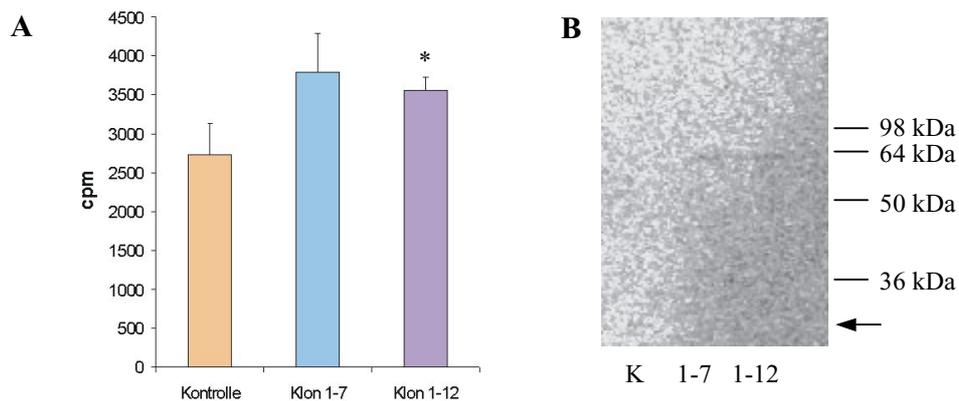


Abb.3.25 Sulfatierungsassay mit *hTPST1ΔTMD*. Je 10 μ l der konzentrierten Ni-NTA Eluate aus X-33 pPICZ α B, X-33 pPICZ α B *hTPST1ΔTMD* Klon 1-7 und Klon 1-12 wurden im Sulfatierungs-Assay eingesetzt. 40 μ l der Ansätze wurden entweder im Scintillations-Messgerät analysiert (**A**) oder im 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf das Erscheinen von $^{35}\text{SO}_4$ -Hirudin untersucht (Exposition: 3 Wochen). Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben; $n = 3$. * $P < 0.05$ gegenüber der Kontrolle ohne *hTPST1ΔTMD*. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von $^{35}\text{SO}_4$ -Hirudin im 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

In Abb.3.25A sind die Ergebnisse des Sulfatierungsassays dargestellt. Das in X-33 exprimierte und an Ni-NTA angereicherte *hTPST1ΔTMD* bindet einen Teil des ^{35}S -PAPS. Im Vergleich zur Kontrolle ist eine Steigerung der Radioaktivität im Scintillationszähler zu erkennen (Abb.3.25A). Diese Steigerung der Radioaktivität ist für Klon 1-12 signifikant (131%, 1,3-fach im Vergleich zur Kontrolle) und für Klon 1-7 aufgrund einer größeren Schwankung der Messwerte tendenziell (139%, 1,4-fach im Vergleich zur Kontrolle). Im SDS-Polyacrylamid-Gel konnte kein sulfatiertes ^{35}S -Hirudin nachgewiesen werden (Abb.3.26B). Die nach drei Wochen Exposition des Gels zum Film entstandenen Banden bei 62 kDa sind als Nebeneffekte einzustufen. Die im Scintillations-Messgerät bestimmten Radioaktivitäts-Mengen sollten ein stärkeres Signal während der Exposition hervorrufen.

Abb.3.26 zeigt die während der Reaktionszeit an *hTPST1ΔTMD* gebundene ^{35}S -Menge.

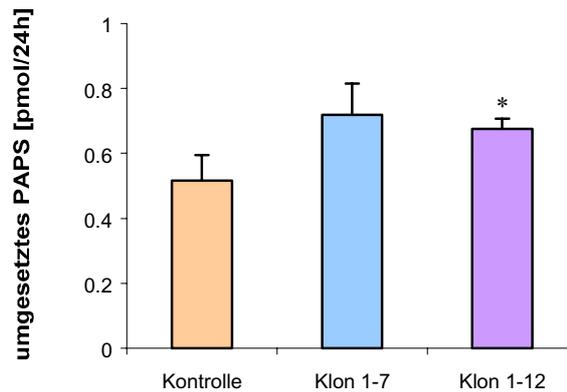


Abb.3.26 Im Sulfatierungsassay an *hTPST1ΔTMD* gebundene $^{35}\text{[S]}$ -Menge.

Von insgesamt 450 pmol pro Ansatz eingesetztem $^{35}\text{[S]}$ -PAPS wurde in allen Reaktionen wenig Sulfat an *hTPST1ΔTMD* gebunden. Ein Grund hierfür könnte der schnelle Abbau und damit die schnelle Inaktivierung von *hTPST1ΔTMD* sein. Allerdings muss auch beachtet werden, dass $^{35}\text{[S]}$ -PAPS im Überschuss im Reaktionsansatz vorhanden sein muss.

3.8.3.2 Expression und Reinigung von *hTPST2ΔTMD*

3.8.3.2.1 Auswahl der Expressionsklone

Für die Expression von *hTPST2ΔTMD* in X-33 wurde zuerst getestet, ob eine Expressionsstrategie nach Mut^+ - oder nach Mut^s -phänotypischen Zellen eine höhere Ausbeute zeigt. Dazu wurden je zwölf 20 ml Kulturen X-33 pPICZ α B *hTPST2ΔTMD* und zwei Kontroll-Kulturen X-33 pPICZ α B entsprechend dem Protokoll für Mut^+ und Mut^s für 5 d exprimiert (2.2.6.3, 2.2.6.4). Je 1 ml Zell-Kultur wurde zentrifugiert, das Medium wurde durch TCA-Fällung zehnfach konzentriert und die Zellen wurden in $1/10$ -tel Breaking-Puffer mit Glaskugeln aufgeschlossen. Die Analyse der Expression erfolgte im Western-Blot (Abb.3.27) mittels eines anti-TetraHis-Antikörpers (1:2000; Qiagen, Hilden).

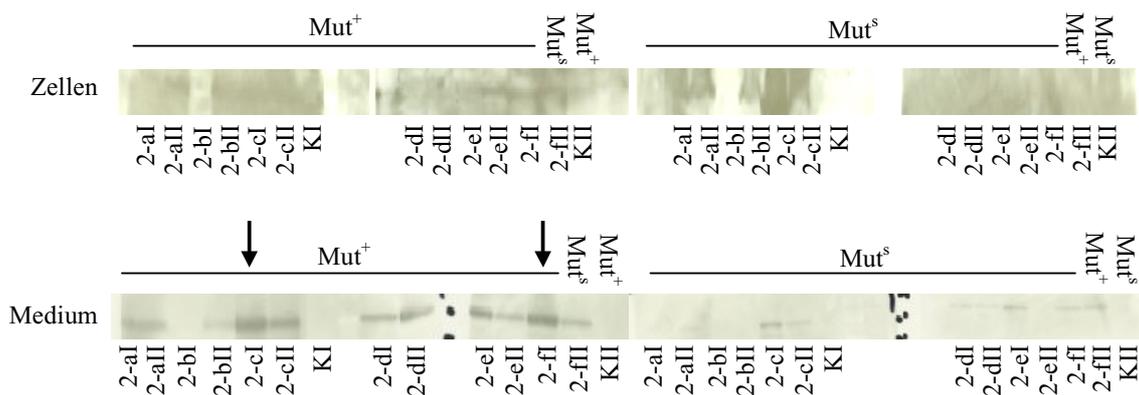


Abb.3.27 Western-Blot-Analyse der Testexpression von *hTPST2ΔTMD* in X-33. Für die Expression wurden je 20 ml Schüttelkulturen angesetzt, die jeweils nach Mut⁺ und nach Mut^s behandelt wurden. Insgesamt wurden 12 Klone X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* (aI, aII bis fI, fII) und 2 Klone X-33 pPICZαB als Kontrolle (KI, KII) getestet. Das Medium wurde zehnfach konzentriert und die Zellen wurden in $\frac{1}{10}$ -tel der ursprünglichen Kulturmenge in Breaking-Puffer mit Glaskugeln aufgeschlossen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel mit anschließendem Proteintransfer auf PVDF-Membran. Proteine mit His-Tag wurden durch anti-TetraHis-Antikörper (1:2000; Qiagen, Hilden) detektiert. Die Pfeile markieren die Klone und die experimentelle Anordnung, die weiter verwendet wurde.

hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆ wird von den einigen X-33-Klonen exprimiert wird. Die Expressionsrate und die Lokalisation der exprimierten Proteine variiert zwischen den einzelnen Klonen. Erfolgt der Expressionsansatz entsprechend dem Mut⁺-Phänotyp (wie erwartet für X-33), so wird *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* gebildet und ins Medium sezerniert (2-aI, 2-aII, 2-cI, 2-cII, 2-dI, 2-dII, 2-eI, 2-eII, 2-fI, 2-fII). Wurden die Expressionsansätze nach dem Mut^s-Phänotyp durchgeführt, so wurde weniger *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* gebildet, das sich hauptsächlich innerhalb der Zellen anreichte (2-aI, 2-aII, 2-bII). *P. pastoris*-Zellen sekretieren wenige Proteine ins Medium. Das Medium selber besteht ebenfalls kaum aus Proteinen. Aufgrund fehlender Proteasen im Medium ist die Aufreinigung von sezernierten Proteinen einfacher. Deshalb wurde die folgende Expression von *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* nach dem Mut⁺-Phänotyp mit den Klonen 2-cI, 2-fI und einer Kontrolle (KI) durchgeführt.

3.8.3.2.2 Expression von *hTPST2ΔTMD* in X-33-Zellen

Für die Expression wurden Übernachtkulturen von X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* Klon 2-cI und Klon 2-fI und X-33 pPICZαB als Kontrolle in BMMY-Medium auf OD₆₀₀ = 1 verdünnt und für 5 d bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch die tägliche Zugabe von 0,5% Methanol. Nach Beendigung der

Expression wurden die Zellen und das Medium durch Zentrifugation voneinander abgetrennt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Überprüfung der Expression von *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆ wurde aus je einem ml Kultur das Medium zehnfach konzentriert und die Zellen in $\frac{1}{10}$ -tel Breaking-Puffer mit Glaskugeln aufgeschlossen. Das Ergebnis ist in Abb.3.28 dargestellt.

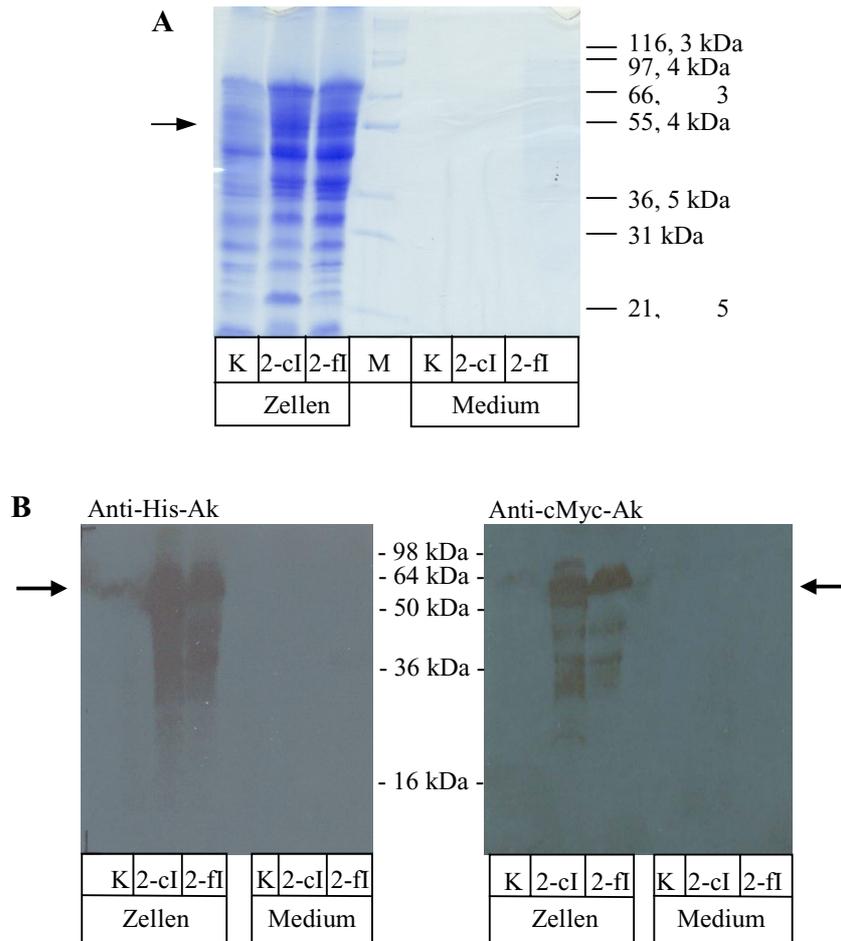


Abb.3.28 SDS-PAGE und Western-Blot zur Analyse der Expression von *hTPST2ΔTMD* in X-33-Zellen. Zur Expression von *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆ wurden X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* Klone 2-cl und 2-fl und X-33 pPICZαB als Kontrolle (K) nach Mut⁺-Phänotyp-Ansatz induziert. Nach 5 d Inkubation wurden Medium und aufgeschlossene Zellen im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie gefärbt (**A**). (**B**) Die in einem zweiten identischen SDS-Polyacrylamid-Gel enthaltenen Proteine wurden auf PVDF-Membran transferiert und mit anti-TetraHis-Antikörper (1:2000; Qiagen, Hilden) bzw. mit anti-cMyc-Antikörper (1:200; Sigma, Taufkirchen) detektiert. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆ (M, Mark 12 Standard)

In Teil A der Abb.3.28 ist die Analyse der Zellproteine und der im Medium enthaltenen Proteine im SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung dargestellt. Im Vergleich zu der Kontroll-Expression (K) ist weder in den Zell- noch in den Medienproben der Klone 2-cl und 2-fl (Abb.3.28A) ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht für *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* zu detektieren. In den in Abb.3.28B gezeigten Western-Blots sind die gleichen Proben mittels der spezifischen Antikörper anti-TetraHis- und anti-cMyc-Antikörper analysiert. In den Western-Blots ist zu erkennen, dass *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* in den Klonen 2-cl und 2-fl exprimiert wird. Diese Expression wird von beiden verwendeten Antikörpern bestätigt. Die Detektion erfolgte in den Gesamt-Zelllysaten, nicht im Medium. Demnach kam es im Gegensatz zu der Testexpression zur Bestimmung des Mut-Phänotypes (3.8.3.2.1) zu keiner Abspaltung des N-terminalen α -Sekretionssignals vom Zielprotein. Zur Einschätzung des apparenten Molekulargewichtes für *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* muss die mögliche Glykosylierung des Proteins an zwei Aminosäuren und das N-terminale α -Sekretionssignal in Betracht gezogen werden. Das theoretische Molekulargewicht beträgt demnach zwischen 51436 Da ohne Glykosylierung (aufgrund der primären Aminosäure-Sequenz) und 61156 Da bei maximaler Glykosylierung des Proteins (maximal 30 D-Mannose-Reste pro Glykosylierungsstelle; entspricht einem zusätzlichen Molekulargewicht von je 4,86 kDa) durch die Hefezelle und vorhandenem α -Sekretionssignal. Mit einem anhand des Western-Blots geschätzten Molekulargewicht des exprimierten Proteines von 60 kDa liegt *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* wahrscheinlich glykosyliert vor.

3.8.3.2.3 Reinigung von aktivem *hTPST2ΔTMD*

Durch Ni-Chelat-Chromatografie (2.2.2.5) sollte *hTPST2ΔTMD* angereichert werden. Dies wurde mit den Gesamt-Zelllysaten der Klone 2-cl und 2-fl und der Kontrolle durchgeführt. Die Elution der Proteine von der Matrix erfolgte unter hoher Imidazol-Konzentration (250 mM). Die Analyse der Proteinlösungen mittels Coomassie und Western-Blot nach SDS-PAGE ist in Abb.3.29 dargestellt.

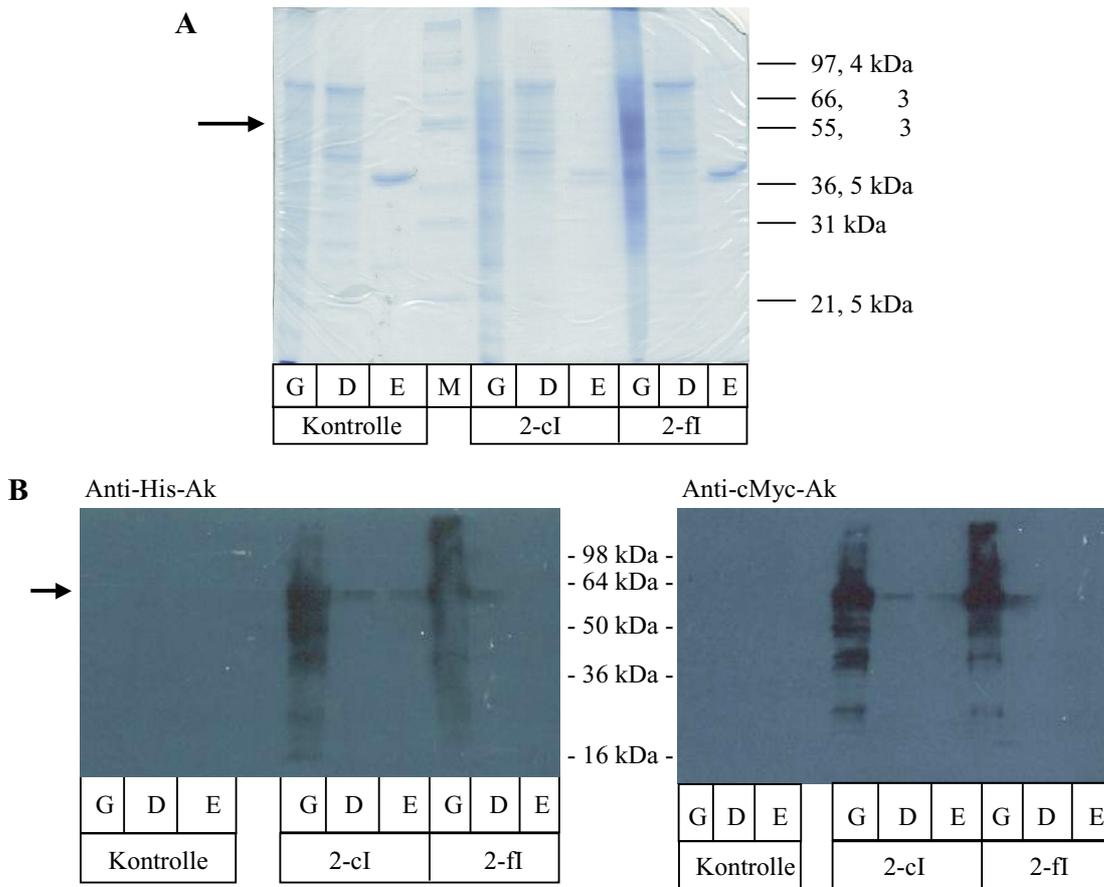


Abb.3.29 SDS-PAGE und Western-Blot zur Analyse der Anreicherung von *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* an Ni-NTA-Matrix. X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* Klone 2-cl und 2-fl und X-33 pPICZαB (Kontrolle) wurden in Breaking-Puffer mit Glaskugeln aufgeschlossen. Die löslichen Proteine der Zellysate wurden an Ni-NTA angereichert. Die Elution erfolgte bei 250 mM Imidazol. Proteinlösungen aus verschiedenen Proben wurden (A) im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Coomassie detektiert. (B) Die Proteine eines identischen SDS-Polyacrylamid-Geles wurden auf PVDF-Membran transferiert und dort durch Western-Blotting mit anti-TetraHis-Antikörper (1:2000; Qiagen, Hilden) und anti-cMyc-Antikörper (1:200; Sigma, Taufkirchen) nachgewiesen. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆*. (G, Gesamt-Zellysate; D, Durchfluß Ni-NTA; E, Eluat Ni-NTA; M, Mark 12 Standard)

Die aus den Expressions-Zellen gewonnenen Proteinlösungen sind im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel dargestellt (Abb.3.29A). In den Proben konnte *hTPST2ΔTMD-cMyc-His₆* aufgrund geringer Konzentration nicht eindeutig zugeordnet werden. In den dargestellten Western-Blots (Abb.3.29B) konnten sowohl mit dem anti-His-Antikörper als auch mit dem anti-cMyc-Antikörper Proteine mit dem entsprechenden Molekulargewicht spezifisch detektiert werden. Ob die Eluate der Ni²⁺-Chelatchromatografie aktives *hTPST2ΔTMD* enthalten, wurde im TPST-Enzymaktivitätsassay untersucht (2.2.2.9)(Abb.3.30).

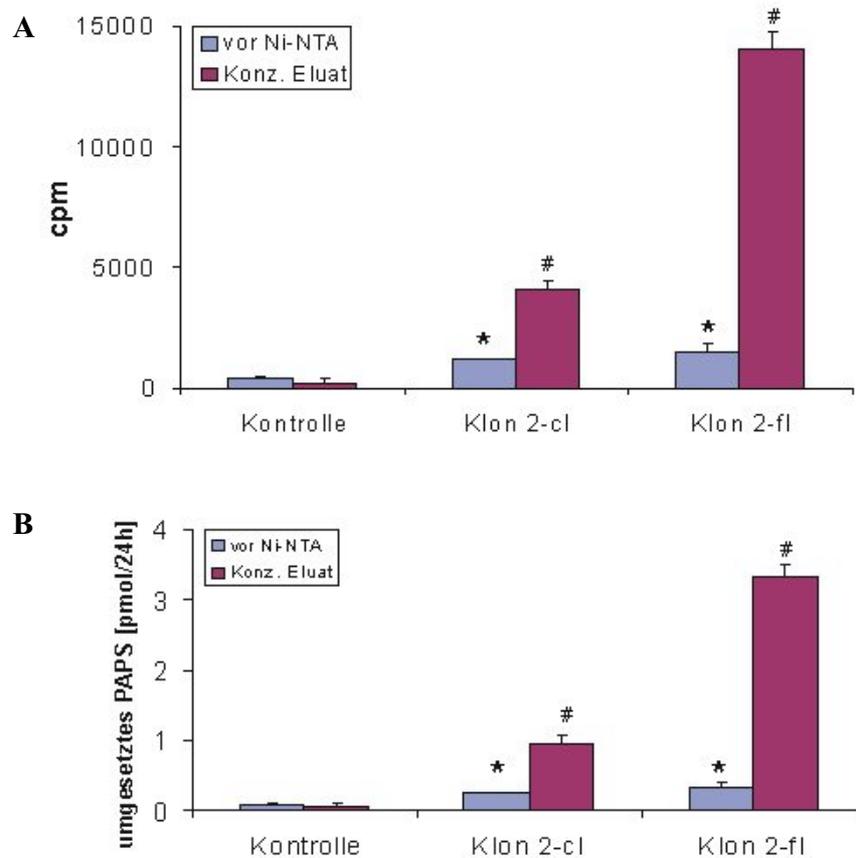


Abb.3.30 TPST-Aktivitätsassay mit *hTPST2ΔTMD*. Je 10 μ l Probe pro 50 μ l Ansatz wurden eingesetzt. Als Akzeptor diente His-Hirudin. Die Sulfatierungs-Reaktion erfolgte bei 37 °C über 24 h. (**A**, inkorporierte Radioaktivität in counts pro Minute; **B**, umgesetztes Substrat ^{35}S -PAPS). Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben; $n = 3$. * $P < 0,008$ gegenüber der Kontrolle vor Ni-NTA; # $P < 0,008$ gegenüber der Kontrolle nach Ni-NTA. (Kontrolle, X-33 pPICZ α B; 2-cl, X-33 pPICZ α B *hTPST2ΔTMD* Klon 2-cl; 2-fl, X-33 pPICZ α B *hTPST2ΔTMD* Klon 2-fl)

Anhand der Abb.3.30 ist zu erkennen, dass lösliches und aktives *hTPST2ΔTMD* in den Proteinlösungen enthalten ist. Der radioaktive Sulfuryl-Rest des Donors [^{35}S]-PAPS konnte während der Reaktion an Proteine gebunden werden. Diese Bindungsaktivität konnte in beiden (2-cl, 2-fl) *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆-exprimierenden X-33-Klonen nachgewiesen werden und durch Proteinanreicherung mittels Ni-Chelatchromatografie gesteigert werden.

Aus den X-33-Zellen (Klone 2-cl und 2-fl) konnte demnach *hTPST2ΔTMD* gereinigt werden, das eine Aktivität gegenüber PAPS aufweist (357-fach im Vergleich zur Kontrolle für 2-cl, 823-fach im Vergleich zur Kontrolle für 2-fl). Diese Werte entsprechen einer *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆-Anreicherung von 3,5 \times für Klon 2-cl bzw.

9,4× für Klon 2-fl und einer Ausbeute von 0,8% für Klon 2-cl bzw. 1,4% für Klon 2-fl bezogen auf die theoretische Ausgangs-Menge von *hTPST2ΔTMD*-cMyc-His₆ errechnet aus der inkorporierten Radioaktivität.

Ob es bei der gemessenen Bindung des radioaktiven Sulfuryl-Restes zur Übertragung desselben auf Modellsubstrat Hirudin als Akzeptor kommt, sollte durch SDS-PAGE der Sulfatierungsansätze und anschließender Detektion von ³⁵SO₄²⁻-Hirudin im Gel bestimmt werden (Abb.3.31).

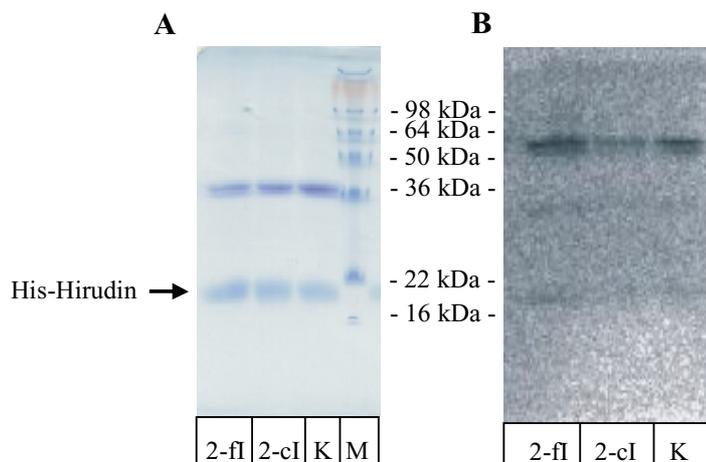


Abb.3.31 SDS-Polyacrylamid-Gel mit Sulfatierungsansätzen. Proben verschiedener Ansätze mit *hTPST2ΔTMD* aus Klon 2-cl, 2-fl und der Kontrolle (Abb.3.30) wurden im 17,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Coomassie angefärbt (A) und das Gel wurde anschließend zur Detektion radioaktiv markierter Proteine für 3 Wochen einer Imaging-Platte exponiert. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von His-Hirudin. (K, Proben aus X-33 pPICZαB; 2-cl, Proben aus X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* Klon 2-cl; 2-fl, Proben aus X-33 pPICZαB *hTPST2ΔTMD* Klon 2-fl; M, SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard)

Abb.3.31A zeigt im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel eine prominente Proteinbande bei 36 kDa. Diese Protein-Bande ist in Abb.3.29 ebenfalls als Hauptprotein beschrieben worden und stellt aufgrund des gezeigten apparenten Molekulargewichtes nicht *hTPST2ΔTMD* dar. Eine im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel erkennbare Protein-Bande bei 20 kDa zeigt His-Hirudin. In Teil B der Abb.3.31 ist die Verteilung des radioaktiven Sulfuryl-Restes im SDS-Polyacrylamid-Gel dargestellt. Nach drei Wochen Exposition des Gels zu einer Imaging-Platte konnten in allen drei untersuchten Proben (Kontrolle ohne *hTPST2ΔTMD*, 2-cl und 2-fl mit *hTPST2ΔTMD*) Protein-Banden detektiert werden (57 kDa, 32 kDa, 20 kDa). Diese Banden wurden in gleicher Stärke ebenfalls in der Kontrolle detektiert. Es handelt sich demnach um eine

unkatalysierte Bindung des ^{35}S -Sulfuryl-Restes oder des ^{35}S -PAPS-Moleküls an ein Protein im Reaktionsansatz. Es musste überprüft werden, ob der Sulfuryl-Rest von ^{35}S -PAPS auf His-Hirudin übertragen, jedoch während der SDS-PAGE von Hirudin abgespalten wird. Dazu wurden die Sulfatierungsansätze mittels nativer-PAGE analysiert (Abb.3.32).

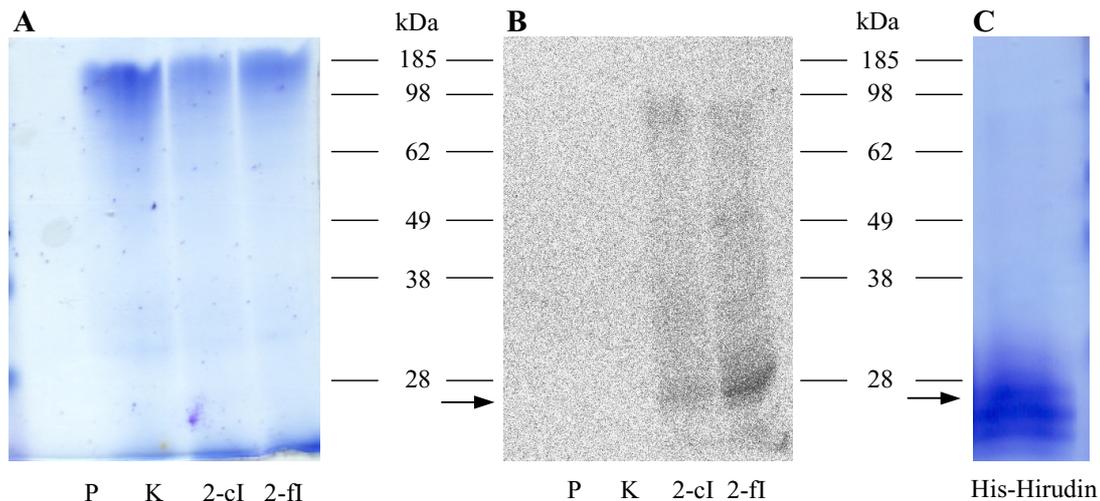


Abb.3.32 native-PAGE von Sulfatierungsansätzen mit *hTPST2ΔTMD*. **A**, je 10 μl der Probenansätze wurden im 10%-igen nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie. **B**, das Polyacrylamid-Gel wurde getrocknet und für 3 d einer Imaging-Platte exponiert. **C**, Laufverhalten von His-Hirudin im verwendeten Puffer-System.

(Sulfatierungsassay mit P, Puffer als Probe; K, Kontrolle als Probe; 2-cl, *hTPST2ΔTMD* Klon 2-cl als Probe; 2-fl, *hTPST2ΔTMD* Klon 2-fl als Probe; His-Hirudin = 2 nmol)

Das in Abb.3.32B gezeigte Radioaktivitäts-Image des SDS-Polyacrylamid-Geles zeigt nach nur 3 d Exposition zur Imaging-Platte radioaktiv-markierte Proteine. Die Detektion der Proteine kann nur dann erfolgen, wenn die Proteine ^{35}S gebunden haben. Diese „markierten“ Proteine sind nur in den *hTPST2ΔTMD*-enthaltenden Sulfatierungsansätzen (2-cl, 2-fl) nachweisbar. Die Menge der detektierten Radioaktivität entspricht der Zählrate im Scintillations-Messgerät. Die Hauptprotein-Bande im Image (Abb.3.32B) verhält sich ähnlich in ihrem Laufverhalten zu His-Hirudin im gleichen Puffer-System (Abb.3.32C). Daraus kann geschlossen werden, dass der Sulfuryl-Rest von ^{35}S -PAPS auf His-Hirudin übertragen wurde. Das bedeutet gleichzeitig, dass das in X-33 exprimierte *hTPST2ΔTMD* aktiv ist und die Sulfatierung von geeigneten Tyrosyl-Resten katalysiert. Diese *hTPST2ΔTMD*-Aktivität wird auch durch die Übertragung des

radioaktiven Sulfuryl-Restes auf weitere geeignete Tyrosyl-Reste, die sich innerhalb von Proteinen im Sulfatierungsassay befinden, bestätigt.

Somit ist die Expression von löslichem und katalytisch aktivem *hTPST2* in X-33-Hefezellen gelungen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die *hTPST2ΔTMD*-angereicherte Proteinlösung die Übertragung des Sulfuryl-Restes auf geeignete Substrate katalysiert. Der Nachweis erfolgte in direkter Weise durch die Detektion des sulfatierten Substrates.

4. Diskussion

4.1 Intrazelluläre Lokalisation von *hTPST1*

Sulfatierte Tyrosyl-Reste sind i. d. R. in Proteinen nachgewiesen worden, die entweder sezerniert werden oder in der Plasmamembran verankert sind (Niehrs *et al.*, 1994). Dazu gehören beispielsweise der Blutgerinnungsfaktor VIII (Leyte *et al.*, 1991), Fibrin (Meh *et al.*, 2001), Cholecystkinin (Vargas *et al.*, 1994), die Glykoprotein Hormonrezeptoren (Costagliola *et al.*, 2002), der PSGL-1 Rezeptor (Rodgers *et al.*, 2001) und der Chemokin-Rezeptor CCR5 (Seibert *et al.*, 2002). Die Sulfatierung von Proteinen durch Tyrosylprotein Sulfotransferasen spielt eine entscheidende Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen, in Prozessen wie z. B. der Entzündungshemmung, der Blutgerinnung und der Plaque-Bildung in blutführenden Gefäßen.

Da die Substrate der TPSTs vor ihrer Sekretion bzw. dem Einbau in die Plasmamembran den sekretorischen Apparat durchqueren müssen, wurde damit übereinstimmend die Lokalisation der TPSTs im sekretorischen Apparat, genauer im Golgi-Apparat, vermutet (Baeuerle *et al.*, 1987). Diese Vermutung wird durch die Aminosäure-Sequenz der Proteine (Beisswanger *et al.*, 1998; Ouyang *et al.*, 1998a; Ouyang *et al.*, 1998b) und ihr *in vitro*-bestimmtes pH-Optimum (Niehrs *et al.*, 1990a; William *et al.*, 1997; Ramaprasad *et al.*, 1998b) unterstützt. Außerdem konnte die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten mit solubilisierten Proteinen aus Golgi-Membranen nachgewiesen werden (Niehrs *et al.*, 1990a). All diese Aussagen in Bezug auf die Lokalisation der TPSTs beruhen auf indirekten Nachweisen. Der direkte subzelluläre Nachweis der Proteine mittels spezifischen Antikörpern oder durch Fusionsproteine erfolgte nicht. In dieser Arbeit wurde die Frage nach der Lokalisation der TPSTs abschließend geklärt (Abschnitt 3.3). *hTPST1*-GFP konnte in der Peripherie des Zellkerns entsprechend dem Golgi-Apparat detektiert werden. Diese Lokalisation wurde durch die präzise Kolo­kalisierung mit Golgin-97, einem bekannten Markerprotein für den Golgi-Apparat (Griffith *et al.*, 1997; Kjer-Nielsen *et al.*, 1999; Barr, 1999), bestätigt. Durch Fluoreszenz-Mikroskopie wurde also nachgewiesen, dass *hTPST1* im Golgi-Apparat von COS-7-Zellen lokalisiert ist, wenn es als GFP-Fusionsprotein exprimiert wird.

4.2 Beeinflussung der Expression von *hTPST*-Isoformen *in vivo*

An sezernierten Proteinen bzw. an Proteinen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, kann eine Sulfatierung von Tyrosyl-Resten erfolgen. Die Sekretionsrate von Proteinen ist bei manchen Zellen sehr hoch. Dazu gehören die Endothelzellen, die die innere Verkleidung von Blutgefäßen bilden. Die Zusammensetzung der von diesen Zellen sezernierten Proteine ändert sich in Abhängigkeit vom Blutfluss und damit auch von der Schubspannung, die von dem Blutstrom auf die Endothelzellen ausgeübt wird (Davies *et al.*, 1997; Topper *et al.*, 1999). Da die auszuschleußenden Proteine den sekretorischen Apparat durchqueren müssen, steht den TPSTs ein geändertes Substratspektrum zur Verfügung. Die Änderung des Substratspektrums könnte eine nachfolgende Änderung der Expressionsraten von TPST1 und TPST2 erforderlich machen, falls beide Enzyme unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Substraten besitzen. Eine unterschiedliche Substratspezifität beider Isoformen wurde bereits von Ouyang und Moore vorgeschlagen (Ouyang *et al.*, 1998b). Ob die Schubspannung die Expression der TPSTs beeinflusst, ist bisher nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit konnte durch kombinierte RT-PCR gezeigt werden, dass die mRNAs beider *hTPST*-Isoformen in humanen Endothelzellen koexprimiert werden (Abschnitt 3.4.1). Die Expression der *hTPSTs* in HUVEC wird durch biomechanische Kräfte beeinflusst. Diese Beeinflussung der *hTPST*-Expression durch Schubspannung, die neben der Dehnung aufgrund des Blutflusses auf die Endothelzellen einwirkt, wurde auf dem mRNA-Niveau für beide Isoformen (Abschnitte 3.4.2. und 3.4.4) und auf dem Protein-Niveau für *hTPST1* nachgewiesen (Abschnitt 3.4.3). Änderungen, die auf dem mRNA-Niveau sichtbar waren, konnten direkt proportional auf das Protein-Niveau übertragen werden. Die Regulation der *hTPST*-Expression der Endothelzellen auf Schubspannung erfolgt dosis- und zeitabhängig. Die Expression von *hTPST2* ist dominant bei höheren Schubspannungen, und die Herauf-Regulation erfolgt bereits nach 4 h. Im Gegensatz dazu verringert sich die Expression von *hTPST1* erst 24 h nach Einsetzen des Stimulus. Die unterschiedliche Regulation der Expression beider Isoformen beruht wahrscheinlich auf der intrazellulären Weiterleitung des Signals über unterschiedliche Kaskaden. So konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor RO-31-8220 für die PKC-abhängige Signal-Kaskade die Steigerung der *hTPST2*-mRNA-Expression verhindert, während Herbimycin

A als Inhibitor für Tyrosin-Kinasen die Herabregulation der Transkription für *hTPST1* aufgrund von Schubspannung verhindert (Abschnitt 3.4.5).

Demnach könnte die Expression der einzelnen *hTPST*-Isoformen unter der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren liegen, die selbst durch biomechanische Kräfte unterschiedlich beeinflusst werden. Die Regulation verschiedener Gene durch Phosphorylierungs-Ereignisse als Antwort auf Schubspannung ist bekannt (Traub *et al.*, 1998). So konnte nachgewiesen werden, dass die Kinasen ERK1/2, ERK5 (BMK-1) und p38 durch Schubspannung reguliert werden. Zusätzlich beeinflusst der Blutfluss die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie *c-fos*, *c-jun* und *c-myc*. Weiterhin ist bekannt, dass Schubspannung die Aktivität der Kinase JNK/SAPK reguliert und die Apoptose von Endothelzellen verhindert (Traub *et al.*, 1998). Ausserdem induziert ein höherer Blutfluss unterschiedliche Expressions-Niveaus anderer Sulfotransferasen (CHST1 und CHST2) in vaskularen Endothelzellen und beeinflusst damit die L-Selektin-vermittelte Anlagerung von Leukozyten (Li *et al.*, 2001).

Endothelzellen sind somit aufgrund extrazellulär einwirkender Kräfte in der Lage, das *hTPST*-Isoform-Verhältnis den zellulären Notwendigkeiten exakt anzupassen. Die direkte oder indirekte Induktion des Isoform-Wechsels könnte zur Tyrosyl-Sulfatierung von unterschiedlichen Gruppen von Proteinen führen. Da die Tyrosyl-Sulfatierung die Bindungsaffinität von Proteinen, u. a. der Selektine, der Blutgerinnungsfaktoren und ihrer Liganden, zueinander erhöht, könnte die Modulation des *hTPST1/hTPST2*-Verhältnisses durch Schubspannung innerhalb von Endothelzellen einen direkten Einfluss auf eine Reihe intra- und extrazellulärer Prozesse haben (Wilkins *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1995).

Statistische Überschlagsrechnungen aufgrund von „*Pulse-Chase-Experimenten*“ zeigen, dass jedes zwanzigste von HepG2-Zellen sezernierte Protein und jedes dritte von Fibroblasten sezernierte Protein einen sulfatierten Tyrosyl-Rest besitzt (Hille *et al.*, 1990). Es wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass das Verhältnis in von HUVEC sezernierten Proteinen ähnlich ist. Deshalb wurde mit Hilfe eines proteomischen Ansatzes versucht, Tyrosyl-sulfatierte Proteine im Überstand der Zellen zu identifizieren und, falls möglich, dadurch die Substrat-Spezifität der *hTPSTs* zu bestimmen (Abschnitt 3.4.6). Alle Proteine mit mehr als 5 ng im Probenansatz (entspricht ca. 250 ng/ml) konnten mittels Silberfärbung nach der Auftrennung in einem 2-

dimensionalem Gel sichtbar gemacht werden (Ausubel *et al.*, 1994). Bei diesen Versuchen konnten keine variierenden Protein-Spots zwischen den einzelnen Proben im SDS-Polyacrylamid-Gel detektiert werden. Die Hauptmenge der pro Versuch eingesetzten 450 µg Gesamtproteine im Zell-Überstand besteht aus Proteinen des fetalen Kälberserums (FCS), die dem Medium als Nahrungsquelle für die Zellen zugesetzt werden. Zusätzliche spezifisch sezernierte Proteine (mit den untersuchten Einschränkungen wie pH-Wert und Molekulargewicht) konnten in den durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Der Grund hierfür ist die geringe Konzentration dieser Proteine im Zell-Überstand. In den Blutgefäßen befindet sich im Verhältnis zum Plattenkegel-Viskosimeter-Versuch weniger Flüssigkeit auf den Zellen. Dadurch können höhere Konzentrationen einzelner Proteine im Blut erreicht werden. Beispielsweise liegt das von Willebrand Faktor Propeptid im Blutplasma mit einer Konzentration von 1 µg/ml vor, das aktive Peptid mit 10 µg/ml (Sadler, 1998). Die Konzentration von Thrombin im Blutplasma schwankt zwischen < 1 nM und 1500 nM, von Faktor VIIIa zwischen niedrigen pM bis 0,3 nM, von Faktor Xa zwischen niedrigen pM und 1 nM und von Faktor XI zwischen 1 pM und 15 pM (Butenas *et al.*, 1997). Diese Konzentrationen wurden im Medium in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht erreicht.

Möchte man diesen Ansatz weiter verfolgen, sollte die Dauer des Experimentes erhöht werden, sowie die Menge des zugesetzten Mediums (soweit möglich) verringert werden. Außerdem ist eine Konzentrierung der Proteine bzw. eine vorherige Auftrennung (z.B. durch HPLC oder Blue-Sepharose) nach Applikation der Schubspannung denkbar. Zur Identifizierung von sulfatierten Proteinen könnte ³⁵S-markiertes PAPS den Zellen zugegeben werden. Leider stand im Rahmen dieser Arbeit keine 2-Dimensionale Gelapparatur für radioaktives Arbeiten zur Verfügung.

Durch die Identifizierung von TPST1 und 2 spezifischen Substraten könnte die Bedeutung jeder Isoform bei wichtigen physiologischen Vorgängen (u. a. Blutgerinnung, Entzündungshemmung, Abwehr von Pathogenen) bestimmt werden. Die Koexpression einer TPST-Isoform mit seinen spezifischen Substraten *in vivo* könnte zum besseren Verständnis dieser physiologischen Vorgänge beitragen und evtl. eine Möglichkeit zur

Beeinflussung dieser Vorgänge aufzeigen, die im Idealfall zur Entwicklung geeigneter Therapien benutzt werden kann.

4.3 Expression von rekombinanten aktiven *h*TPSTs

Die Herstellung von rekombinanten, löslichen Proteinen ist Ausgangspunkt für ihre biochemische Charakterisierung und Strukturaufklärung und die Identifizierung ihrer Substrate und Inhibitoren. Anhand der humanen zytosolischen Dopamin Sulfotransferase (SULT1A3) konnte gezeigt werden, dass die in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen exprimierten Enzymen dem nativen Protein entsprechen (Dajani *et al.*, 1999b). Die Lokalisation von Typ II Membranproteinen im Golgi-Apparat erfolgt durch Interaktionen mit spezifischen Lipid-Domänen (Munro, 1998) und/oder mit anderen Golgi-Proteinen (Lanoix *et al.*, 1999). Diese Interaktionen scheinen durch die Transmembrandomäne und flankierende Regionen bestimmt zu sein (Humphries *et al.*, 1997; Storrie *et al.*, 2000). Um die *h*TPSTs *in vitro* charakterisieren zu können, ist es von Vorteil, die Proteine in wässrigen Puffern löslich und stabil zu halten. Da die Transmembrandomäne die Verankerung der Enzyme in der Membran des Golgi-Apparates vermittelt, wurden die *h*TPSTs ohne ihre N-terminale Transmembrandomäne in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen exprimiert und auf Löslichkeit und Aktivität untersucht.

4.3.1 Expression von Thx-*h*TPST1 Δ TMD *in vitro*

Für die Expression von rekombinanten Proteinen ist ein intakter Translations- und Transkriptionsapparat notwendig. Die Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bietet ein *in vitro*-System an, mit dem innerhalb von 24 h bis zu 6 mg eines rekombinanten Proteins hergestellt werden kann. Das in dieser Arbeit verwendete Zielprotein Thx-*h*TPST1 Δ TMD konnte nach Zugabe von aktivierter Protein Disulfid Isomerase (PDI) und von Chaperonen (GroE, DnaK) zum Reaktionsansatz löslich und aktiv exprimiert werden (Abschnitt 3.5). PDI katalysiert den Austausch von Disulfid-Brücken in Proteinen und wird deshalb bei der Faltung von Proteinen mit verbrückten Cysteyl-Resten eingesetzt (Tang *et al.*, 1988; Darby *et al.*, 1994). Die Steigerung der Aktivität im löslichen Teil des Reaktionsansatzes betrug nach Zugabe von PDI und

Chaperonen 12% im Vergleich zur Reaktion ohne Additiva. Dies ist auf einen gesteigerten Anteil korrekt gefalteter Zielproteine unter Einfluss von PDI und Chaperonen zurückzuführen. Der positive Einfluss von PDI im Reaktionsansatz auf die Löslichkeit des Zielproteins spricht für die Notwendigkeit der Bildung und Rearrangierung von Disulfid-Brücken innerhalb der Polypeptidkette von Thx-*hTPST1ΔTMD*.

Dieser Teilversuch zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, im prokaryotischen Expressionssystem aktives und lösliches *hTPST1ΔTMD* herzustellen. Da der Reaktionsansatz lediglich 1 ml betrug (Volumenbegrenzung durch das System) und die Produktion von Thx-*hTPST1ΔTMD* im µg-Bereich lag, konnte mit dem RTS 500 *E. coli* HY System keine größeren Mengen rekombinantes Protein exprimiert werden. Im Weiteren wurde deshalb heterolog *in vivo* exprimiert.

4.3.2 Löslichkeit von *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in *E. coli*

Die Expression heterologer Proteine in *E. coli* ist bei weitem die einfachste, schnellste und kostengünstigste Methode, um große Mengen eines Proteins herzustellen.

Die *hTPSTs* wurden deshalb ohne ihre N-terminale zytosolische und ihre Transmembrandomäne in verschiedenen *E. coli*-Stämmen exprimiert (Abschnitt 3.6.1). Die Expression der Proteine war meist erfolgreich, allerdings waren die Proteine unlöslich. Durch die Fusion von unlöslichen Proteinen mit bestimmten Proteinen kann die Löslichkeit der Zielproteine erhöht werden. Zu diesen „Helfer“-Proteinen gehören Thioredoxin (Derman *et al.*, 1993) und NusA (Davis *et al.*, 1998). Die Expression einer Reihe von darauf basierenden N-terminalen Fusionsproteinen verbesserte die Löslichkeit der *hTPSTs* nicht, ebenso nicht die Expression bei unterschiedlichen Temperaturen, die Expression unterschiedlicher Mutanten und die Koexpression beider *hTPSTs*. Die Koexpression mit GrpE und ClpB bzw. mit DnaK, DnaJ und GroESL führte ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis (Rabiller, 2002). Die Expression löslicher TPSTs unter Verwendung eines Thioredoxin-Reduktase- und Glutathion-Reduktase-inaktiven *E. coli*-Stammes (Origami (DE3)), der die Bildung von Disulfid-Brücken im Zytosol prinzipiell erlaubt, gelang ebenfalls nicht. Der Aufschluss der Zellen in *hTPST*-stabilisierenden

Puffern und die teilweise Denaturierung der Proteine und anschließende Rückfaltung der *h*TPSTs in protektiven Puffern führte zu keinen löslichen *h*TPSTs (Abschnitt 3.6.2).

Der Grund für diese Schwierigkeiten ist in der Natur der *h*TPSTs zu suchen. Die *h*TPSTs sind im Golgi-Netzwerk lokalisiert. Der Redoxzustand im sekretorischen Weg einer Zelle ist oxidierender (GSH/GSSG-Verhältnis 1:1 bis 3:1, das entspricht einem Redoxpotential von -170 bis -185 mV) als im zytosolischen Teil der Zelle (GSH/GSSG-Verhältnis 30:1 bis 100:1, entsprechend einem Redoxpotential von -221 bis -236 mV) und ergibt damit ein Optimum für die Faltung von Disulfid-verbrückten Proteinen (Hwang *et al.*, 1992). Das Redoxpotential des Mediums beeinflusst die Thermodynamik und die Kinetik der Disulfid-Brücken-Bildung und somit die korrekte Faltung vieler Proteine. *E. coli* besitzt keine membrangebundenen Organellen und das typische zytosolische GSH/GSSG-Verhältnis in *E. coli* liegt daher im Bereich von 50:1 bis 200:1 (Hwang *et al.*, 1992). Die *h*TPSTs besitzen ohne Transmembrandomäne noch weitere 6 Cysteyl-Reste, die vermutlich eine noch unbekannte Anzahl Disulfid-Brücken ausbilden. Das stark reduzierende Medium verhindert die Ausbildung der Brücken und erschwert somit die korrekte Faltung dieser Proteine nach Expression in *E. coli*.

Um diese Probleme zu umgehen, können die als Inclusion Bodies gebildeten Proteine aus den Zellen isoliert, komplett denaturiert und unter geeigneten Bedingungen in ihre aktive Form rückgefaltet werden (Lilie *et al.*, 1998). Der Erhalt von Proteinaktivität ist dabei nicht nur von den Rückfaltebedingungen abhängig, sondern auch vom Protein selbst (Wei *et al.*, 1999). Daher gibt es keine Standardbedingungen, unter denen die Rückfaltung von Proteinen garantiert werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten systematischen Ansätze gründen sich auf akzeptierte Theorien der Proteinlöslichkeit und -faltung, die u. a. das Redoxverhältnis und Kofaktoren berücksichtigen (Rudolph *et al.*, 1996). Ziel der Ansätze war eine Balance zwischen stabilisierenden und destabilisierenden Effekten zu finden (Arakawa und Timasheff, 1982; Arakawa und Timasheff, 1984; Arakawa *et al.*, 1990). Die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen führten zu geringen Konzentration löslichen *h*TPSTs, erfüllten allerdings nicht die Voraussetzungen, dass sich die denaturierten Polypeptidketten zu aktiven Proteinen falten ließen (Abschnitt 3.6.3). Grund hierfür dürften wiederum falsch gebildete Disulfid-Brücken sein. Inwiefern die Proteine Sekundärstrukturen aufwiesen, konnte aufgrund der geringen Protein-

Konzentration mittels CD-Spektrometrie nicht geklärt werden. Fluoreszenz-Messungen und Light-Scattering-Messungen zeigten allerdings die Bildung von Aggregaten. Selbst die bei der Rückfaltung eingesetzten Chaperone (DnaK_{Tth}, DnaJ_{Tth}, GrpE_{Tth}, ClpB_{Tth}), die die vorzeitige Aggregation von noch unvollständig gefalteten Intermediaten verhindern sollten (Cole, 1996), und stabilisierende Substrat-Analoga führten zu keiner Erhöhung der Löslichkeit.

Generell ist die Bestimmung von Rückfaltungsbedingungen für ein spezifisches Protein ein „trial and error“-Problem. In der Literatur werden eine Vielzahl Rückfalte-Zusätze beschrieben, die bei einzelnen Proteinen zum Erfolg führten (Armstrong *et al.*, 1999). Allerdings gestaltete sich die Suche nach einem für die *hTPSTs* geeigneten Zusatz bzw. die Kombination von Zusätzen zeit- und materialaufwendig.

4.3.3 Expression von *hTPST1ΔTMD* in Insekten-Zellen Sf21

Die Vorteile einer heterologen Protein-Expression in Insektenzellen liegen in der Benutzung starker Gen-Promotoren, entbehrlicher Virus-Genprodukte geeignet zum Austausch gegen heterologe Gene, einer Auswahl temporaler Faktoren, der enormen Insert-Größe und posttranslationaler Prozessierung. Weiterhin können die Insektenzellen sowohl als Monolayer in Flaschen als auch in Schüttelkultur gehalten werden, was eine Fermentierung ermöglicht. Die Nachteile des Systems bestehen in der diskontinuierlichen Expression, sodass für jede Runde der Proteinexpression frische Zellen mit dem Virus infiziert werden müssen. Außerdem ist der Grad und die Art der Glykosylierung unterschiedlich im Vergleich zu Wirbeltieren. Die von den Insektenzellen produzierten Glykoproteine enthalten relativ einfache, unverzweigte Zuckerketten mit einem hohen Mannose-Anteil.

In dieser Arbeit wurde die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* in den Vektor pBlueBacHis2 A kloniert und anschließend durch homologe Rekombination in den Virus überführt (Abschnitt 3.7). Nach der Herstellung einer Virus-Lösung mit hohem Titer, erfolgte die erneute Überprüfung der Viren auf die korrekte Insertion des Zielgens. Durch unterschiedliche Primerkombinationen konnte mittels PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden, dass die Viren die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* enthielten, und dass diese Information unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters im

korrekten Leserahmen steht. Der Virus war außerdem in der Lage, die verwendeten Wirtszellen Sf21 zu infizieren. Trotzdem erfolgte nach der Transfektion keine Expression von *hTPST1ΔTMD*, die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelen und Western-Blots nachweisbar gewesen wäre. Dies könnte wiederum auf die für Membranproteine typischen Eigenschaften der *hTPSTs* und auf ihre Disulfid-Brücken zurückzuführen sein. Die Infektion von Zellen anderer Insektenzell-Stämme wie den Sf9-Zellen oder den High Five[™]-Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit dem *hTPST1ΔTMD*-Gen-enthaltenden Virus könnte evtl. zu einer Expression des Proteins führen, da die einzelnen Insektenzelllinien auf die Expression einzelner Proteine unterschiedlich reagieren. Bisher veröffentlichte Mengen an von Insektenzellen exprimierten zytosolischen Proteinen können 500 mg/l Zellen für zytosolische Proteine erreichen. Veröffentlichte Mengen an exprimierten Membranproteinen in diesem System liegen weit darunter bei ca. 1 mg/l Zellen (Referenzen in (2002). Für jedes Protein muss demnach in Abhängigkeit von seiner Natur und seinem späteren Gebrauch das geeignete Expressionssystem gefunden werden. Da *hTPST1ΔTMD* in Sf21-Zellen nicht exprimiert wurde, sollte als letztes System die Expression der Proteine in Hefezellen versucht werden.

4.3.4 Expression von *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in *P. pastoris* X-33

4.3.4.1 Vorteile des *P. pastoris* Expressionssystems

Im Vergleich zu anderen Expressionssystemen vereinen Hefezellen die Einfachheit der genetischen Manipulation und die hohen Wachstumsraten der prokaryotischen Organismen mit der Verfügbarkeit der subzellulären Maschinerie zur Durchführung posttranslationaler Modifikationen der eukaryotischen Zellen.

Unter den Hefe-Expressionssystemen ist das auf *Saccharomyces cerevisiae* basierende das am meisten genutzte System. Die *S. cerevisiae* Genetik und Physiologie ist sehr gut bekannt. Obwohl dieses System für die Produktion einiger eukaryotischer, heterologer Proteine benutzt wurde, gibt es deutliche Grenzen. Die Produktmengen des fremden Proteins sind mit 1 – 5% der totalen Proteinsynthese einer Zelle relativ gering und stellen zusätzlich einen Stressfaktor für die Zellen dar (Buckholz und Gleeson, 1991). Weiterhin behindert die Produktion des Genproduktes das Wachstum der Zellen, was auch durch den Einsatz von induzierbaren Plasmid-Promotoren nicht wesentlich verbessert werden

konnte (Buckholz *et al.*, 1991). Die Instabilität des heterolog-exprimierten Proteins ist besonders hoch, wenn das fremde Genprodukt toxisch für die Hefezellen ist. Von *S. cerevisiae* gebildete Glykoproteine werden oft hyperglykosiliert, was u. a. zur Verringerung der Aktivität führen kann. Weiterhin werden Proteine häufig nicht frei ins Medium sezerniert, sondern bleiben im Periplasma der Zellen zurück, was zu Problemen bei der Aufreinigung führen kann. Zusätzlich kann ein „up-scaling“ der Proteinproduktion Probleme bereiten.

Viele dieser Probleme treten bei der Expression von fremden Proteinen in der methylophilen Hefe *P. pastoris* nicht auf. *P. pastoris* besitzt einen starken, induzierbaren Promoter, den *AOX1*-Genpromoter. Außerdem ist der Organismus in der Lage, posttranslationale Modifikationen durchzuführen, die im Gegensatz zu *S. cerevisiae* mehr der humanen Proteinmodifikation ähneln (Anzahl der D-Mannose-Reste und Art der Zucker-Verknüpfung). Die Isolation der heterologen Proteine nach ihrer Sekretion ins Medium ist unkompliziert, da *P. pastoris* kaum endogene Proteine sezerniert. Somit bietet sich *P. pastoris* als geeigneter Wirtsorganismus zur Expression von humanen TPSTs an.

4.3.4.2 Expression von *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* in *Pichia pastoris* X-33

Die genetische Information für *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD* wurde in den pPICZαB *P. pastoris* Expressionsvektor kloniert und durch Transformation in das *P. pastoris* X-33 Genom integriert (Abschnitt 3.8.1). Der Vektor enthält die N-terminale Signalsequenz des *S. cerevisiae* α-Faktors, der den Eintritt des zu exprimierenden Proteins in den Sekretionsapparat gewährleistet.

Bei der Insertion des Vektors in das Hefegenom erfolgt in Abhängigkeit von den Zellen eine unterschiedliche Phänotyp-Ausbildung: Mut⁺ und Mut^s. Mut⁺ bezieht sich auf die Fähigkeit des Wildtypes, mit Methanol als einzige Kohlenstoff-Quelle zu überleben. Die Hefe benötigt dazu das Enzym Alkohol-Oxidase (kodiert vom *AOX*-Gen), die in zwei Isoformen (*AOX1* und *AOX2*) vorliegt. Erfolgt die Insertion des Vektors „upstream“ der 5'-*AOX1*-Promotor-Region, so wird der Transformant generell den Mut⁺-Phänotyp ausbilden. Erfolgt die Rekombination in der 3'-*AOX1*-Promotor-Region („downstream“), wird das Wildtyp *AOX1*-Gen zerstört und der Mut^s-Phänotyp wird sich ausprägen. Mut^s

steht für „Methanol utilization slow“ und bedeutet den Verlust der Alkohol-Oxidase Aktivität kodiert durch das *AOX1*-Gen. Dieser Hefestamm mit einer Mutation im *aox1*-Locus ist Wildtyp für eine zweite Alkohol-Oxidase Aktivität kodiert durch das *AOX2*-Gen. Die Zellen mit dem entsprechenden Phänotyp wachsen langsamer auf Methanol enthaltendem Medium. Die Insertion des Vektors in unterschiedliche Regionen könnte die Expression des Zielproteins beeinflussen, in welcher Weise bei einem bestimmten Protein ist nicht vorherzusagen.

Die verwendeten Wirtshefen X-33 bilden vorwiegend den Mut⁺-Phänotyp aus. Anhand der Mut-Bestimmungsexperimente zeigte sich jedoch, dass die *hTPSTΔTMD* enthaltenden X-33-Klone den selteneren Mut^s-Phänotyp ausbilden (Abschnitt 3.8.2).

Für diese Klone wurden anschließend die optimale Methode und die Bedingungen für die Expression der *hTPSTΔTMDs* bestimmt (Abschnitt 3.8.3). Dazu wurden je zwölf Transformanten auf ihre *hTPST*-Expressionsfähigkeit hin untersucht und die jeweils zwei am stärksten exprimierenden Klone (1-7, 1-12 und 2-cl, 2-fl) wurden für größere Expressionsansätze verwendet. Als Kontrolle der Expression von *hTPST* diente ein X-33-Klon, in dessen Genom der pPICZαB Expressionsvektor ohne genetische Manipulationen integriert wurde und der im folgenden die gleichen Protokolle wie die Hefezellen mit *hTPST1ΔTMD* bzw. *hTPST2ΔTMD* durchlief. Die Analyse der Zellen und des Mediums erfolgte im Western-Blot, da die Expressionsraten mit geschätzten 3 μg Protein/l Zellen für *hTPST1ΔTMD* und ca. 10 μg Protein/l Zellen für *hTPST2ΔTMD* gering waren.

Aufgrund des α-Faktors sollten die exprimierten Proteine in das Medium sezerniert werden, wobei die Erfolgsraten der Sekretion generell variieren (Cregg *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1993). Anhand der in den Western-Blots nachgewiesenen apparenten Molekulargewichte der Proteine ist erkennbar, dass *hTPST1ΔTMD* von X-33-Zellen zwar glykosiliert wird, allerdings nicht sezerniert. Demgegenüber wurde *hTPST2ΔTMD* im Testansatz sezerniert, im grossen Ansatz jedoch nicht. Gründe hierfür konnten nicht gefunden werden. In beiden Fällen kann allerdings aufgrund der intrazellulären Lagerung des Proteins (zumindest in den grösseren Ansätzen) davon ausgegangen werden, dass der α-Faktor N-terminal am Zielprotein verblieben ist. Dies hatte keinen Einfluss auf die Eigenschaften der Proteine. Da sich weiterhin Glykosylierungen positiv auf die Stabilität

der TPSTs auswirken sollten, könnte dadurch evtl. die intrazelluläre Menge der *hTPST* Δ TMDs gesteigert werden.

Durchschnittliche Expressionsraten in *P. pastoris* liegen bei ca. 1 mg Protein/l Zellen (Boettner *et al.*, 2002), obwohl es sich hierbei meist um zytosolische oder um lösliche Proteine handelt. Es gibt jedoch in einzelnen Fällen Raten für die Expression von Membranproteinen in *P. pastoris*, die z. B. 3 mg Protein pro 100 g Zellen (ca. 4 l Expressionskultur; Fryxell *et al.*, 1995) und 1 mg Protein/l Zellen (Weiss *et al.*, 1995) erreichen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein gewünschtes Protein in zufriedenstellendem Maße exprimiert wird, wird vom Vertreiber Invitrogen GmbH (Karlsruhe) mit lediglich 50 – 75% angegeben. Da die Expression der *hTPST*s schwach war, wurde dem Medium 1% Casein zugesetzt. Durch den Einsatz von Casein werden Proteasen im Medium inhibiert, die andernfalls die *hTPST*s verdauen könnten, falls diese doch sezerniert würden. Dies hatte jedoch ebenfalls keine Erhöhung der *hTPST*-Menge zur Folge (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, *hTPST1* Δ TMD und *hTPST2* Δ TMD in *P. pastoris* X-33-Zellen zu exprimieren. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Proteine löslich sind.

4.3.4.3 Ni-Chelat-Chromatografie von *hTPST1* Δ TMD und *hTPST2* Δ TMD

Nach der Expression der *hTPST*s in Hefezellen wurden die löslichen Proteine an einer Ni-NTA-Matrix gereinigt (Abschnitt 3.8.3). In der sich anschließenden SDS-PAGE konnten die *hTPST*s aufgrund ihrer geringen Konzentration lediglich durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Die vor und nach dem Chromatografie-Schritt durchgeführten Aktivitätsbestimmungen zeigten trotz gleicher eingesetzter Proben volumina gesteigerte Radioaktivitätswerte. Dies belegt, dass eine Anreicherung von *hTPST1* Δ TMD und *hTPST2* Δ TMD durch die Ni-Chelatchromatografie erfolgte. *hTPST1* Δ TMD konnte nach Zellaufschluss im TPST-Enzymaktivitätsassay nicht nachgewiesen werden. Durch den Chromatografie-Schritt konnte das Enzym soweit aufkonzentriert werden, dass es im Aktivitätsassay nachweisbar war. Die Anreicherung von *hTPST2* Δ TMD an der Ni-NTA-Matrix im Vergleich zur Probe vor der Ni-Chelatchromatografie (nach dem Zellaufschluss) erfolgte um das 3,5-fache (2-cl) bzw.

um das 9,4-fache (2-fl). Die sehr niedrige Ausbeute von 0,8% (2-cl) bzw. 1,4% (2-fl) nach der Chromatografie bezogen auf die insgesamt exprimierte und lösliche *hTPST2ΔTMD*-Menge (radioaktiv bestimmt nach dem Zellaufschluss) ist wiederum auf die Membranprotein-Eigenschaften der *hTPSTs* zurückzuführen. Auf die schwierigen chromatografischen Eigenschaften der Membranproteine, einschließlich der *TPSTs* und ihrer Fusionsproteine, wird in der Literatur hingewiesen (Niehrs *et al.*, 1990a; Molhoj *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2001). Um eine höhere Ausbeute bei der Aufreinigung erzielen zu können, sollte versucht werden, den chromatografischen Reinigungsschritt unter niedrigeren Salzkonzentrationen durchzuführen. Dies sollte lt. Literatur zu einer geringfügigen Verbesserung der Ausbeute führen (Niehrs *et al.*, 1990a; Molhoj *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2001). Bei einer Verringerung der Salzkonzentration nehmen allerdings unspezifische Bindungen von Histidin-enthaltenden Proteinen an die Ni-NTA-Matrix zu. Deshalb muss eine sorgfältige Optimierung zwischen Salzkonzentration und Aufreinigungseffekt erfolgen. Für eine effektivere Reinigung der *hTPSTΔTMDs* müssen demnach u. U. andere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden (siehe Ausblick).

Im Gegensatz zur Expression der *hTPSTΔTMDs* in anderen Systemen konnten durch die Verwendung von *P. pastoris* X-33-Zellen die Proteine löslich synthetisiert werden. Es gelang zusätzlich die Anreicherung der Proteine, die durch Western-Blot-Analysen belegt ist. Im letzten Schritt musste untersucht werden, ob die exprimierten und angereicherten löslichen *hTPSTΔTMDs* die Sulfatierung von geeigneten Substraten katalysieren.

4.3.4.4 Aktivität von *hTPST1ΔTMD* und *hTPST2ΔTMD*

Für den Fortgang der Arbeit war es notwendig nachzuweisen, dass die synthetisierten und angereicherten *hTPSTΔTMDs* die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten in Proteinen katalysieren (Abschnitt 3.8.3). Dazu wurde ein Assay verwendet, der auf einer Methode von Ramaprasad (Ramaprasad *et al.*, 1998b) beruht. Bei diesem Assay (Abschnitt 2.2.2.9) werden prinzipiell der Sulfat-Donor ($[^{35}\text{S}]$ -PAPS), das Akzeptorprotein (His-Hirudin) und das Enzym (TPST) miteinander inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wird das Nukleotid (PAPS) abgetrennt und die Proteinfraction wird auf Radioaktivität untersucht. Bezogen auf die *hTPSTs* können mit Hilfe des Assays Aussagen über die Bindung der *TPSTs* an PAPS getroffen werden. Um die Sulfatierungsaktivität der *TPSTs*

zu bestätigen, ist der Nachweis einer Übertragung des radioaktiven Sulfuryl-Restes auf das Akzeptormolekül notwendig.

Als TPST-haltige Proben wurden die konzentrierten Eluate der Ni-Chelat-Chromatografie auf ihre katalytischen Sulfatierungs-Eigenschaften überprüft. Als Kontrolle diente ein Ni-Chelat-Eluat, das aus der löslichen Proteinfraction einer Expressionskultur, die nur mit dem leeren Hefe-Vektor pPICZ α B transformiert worden war, gewonnen wurde. Diese Proteinlösung sollte bis auf die *hTPST* Δ TMDs die gleiche Zusammensetzung haben. *hTPST1* Δ TMD Klon 1-7 zeigte eine um 137% (1,4-fach) höhere Bindungsaktivität im Vergleich zum Versuch mit der Kontrolle und damit einen um 0,203 pmol höheren Umsatz an PAPS innerhalb von 24 h. Bei Klon 1-12 betrug die Steigerung des Umsatzes 0,159 pmol innerhalb von 24 h im Vergleich zur Kontrolle. Das entsprechen 131% (1,3-fach).

hTPST2 Δ TMD Klon 2-cI konnte zu 0,8%, um 3,5 \times aus dem Gesamtzellysate angereichert werden. Es erfolgte eine 357-fache Aktivitätssteigerung im Vergleich zur Kontrolle, und es wurden 0,907 pmol PAPS innerhalb von 24 h mehr als im Ansatz mit der Kontrolle umgesetzt werden. *hTPST2* Δ TMD Klon 2-fI wurde um das 9,4-fache bei einer Ausbeute von 1,4% angereichert und zeigte eine 823-fache Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Kontrollversuch. Es wurden 3,285 pmol innerhalb von 24 h mehr PAPS umgesetzt als in der Kontrolle ohne *hTPST2* Δ TMD.

Die geringen Ausbeuten sind, wie bereits im vorigen Abschnitt besprochen, auf die Membranprotein-Eigenschaften der *hTPST* Δ TMDs zurückzuführen, die die chromatografische Aufreinigung erschweren (Niehrs *et al.*, 1990a; Molhoj *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2001). Die Expression und anschließende Anreicherung von löslichen *hTPST*s erfolgte in einigen wenigen Arbeitsgruppen (Ouyang *et al.*, 1998b; Seibert *et al.*, 2002), allerdings sind in den Veröffentlichungen keine Daten zu Aktivität und Reinheitsgrad der Enzyme vermerkt.

Ein grundlegender Unterschied zu den in der Literatur veröffentlichten Sulfatierungsassays und dem in dieser Arbeit verwendeten Assay ist die Inkubationszeit. I. d. R. werden die Assay-Ansätze nur 30 min bzw. 1 h inkubiert, da aufgrund der Instabilität der TPSTs in diesem Zeitraum die höchste Sulfatierungsrate vermutet wird. Die in dieser Arbeit durchgeführte Inkubationszeit von 24 h wurde deshalb gewählt, weil

aufgrund der geringen Expressionsrate und der schwierigen Anreicherung der *hTPSTΔTMDs* in der Probe wenig Sulfotransferase enthalten war. Es sollte damit die Möglichkeit gegeben sein, mehr PAPS umzusetzen. Aufgrund der geänderten Inkubationszeit während des Assays können die bestimmten Umsätze an PAPS nicht mit den Literatur-Werten verglichen werden. Es gibt zusätzlich eine Veröffentlichung, in der die Sulfatierungszeit 100 h betrug (Seibert *et al.*, 2002). Eine Quantifizierung der Umsätze erfolgte allerdings nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Nachweis der Sulfuryl-Übertragung native-PAGE mit den *hTPST2ΔTMD* Klon 2-cl bzw. Klon 2-fl enthaltenen Proben und der Kontrollprobe (ohne *hTPSTΔTMD*, ansonsten gleiche Proteinzusammensetzung) durchgeführt. Anhand von Coomassie-gefärbten Kontroll-Polyacrylamid-Gelen mit His-Hirudin konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein Akzeptor für den ³⁵[S]-Sulfuryl-Rest ist. Die Abspaltung des Sulfuryl-Restes von His-Hirudin in Gegenwart von SDS unter basischen Bedingungen beruht auf den nukleophilen Eigenschaften des Detergenzes und der Instabilität des Sulfuryl-Restes (Seibert *et al.*, 2002). Es kommt dabei zur Hydrolyse des Sulfuryl-Restes, die durch native, reduzierende PAGE verhindert werden kann. Die im nativen Polyacrylamid-Gel nachgewiesenen Radioaktivitäten stimmen mit den bestimmten cpm der Scintillationsmessungen überein. Aufgrund zweier unabhängiger Nachweismethoden wurde die von den Enzymen *in vivo* durchgeführte Katalyse bewiesen und die Expression löslicher und aktiver *hTPSTΔTMDs* bestätigt.

5. Ausblick

Bei den TPST handelt es sich um Typ II Membranproteine. Es wird vermutet, dass bei diesen Proteinen Sequenz-Abschnitte in und um die Transmembrandomäne für die Direktion der Proteine entscheidend sind (Humphries *et al.*, 1997). Ob dies bei den TPSTs ebenfalls so ist, soll in weiteren Untersuchungen, die nicht mehr Teil dieser Arbeit sind, geklärt werden.

In weiterführenden Arbeiten zur Bestimmung der Isoform-abhängigen Substrat-Spezifität muss die Expressionsrate der *hTPSTΔTMDs* erhöht werden. Dazu können multiple Kopien des Zielgens in das Genom der *P. pastoris* X-33-Zellen konstruiert werden (Romanos *et al.*, 1991; Clare *et al.*, 1991a; Clare *et al.*, 1991b). Ein weiterer Ansatz ist die Fermentation der Hefe. Um die Reinigung der *hTPSTΔTMDs* zu verbessern, kann die Wahl eines anderen Sekretionssignales wie des nativen Signals von *P. pastoris* zur Sekretion und damit zu einer ersten Reinigung der *hTPSTΔTMDs* führen. So würde eine sekretorische Expression die Menge kontaminierender Proteine verringern (siehe auch 4.2.4.2). Andererseits könnten alternative Reinigungsmethoden wie Fällungsmethoden und präparative Zentrifugation zu einem aufgereinigteren Protein führen.

6. Zusammenfassung

In den letzten zwei Jahrzehnten zeigte sich, dass die Sulfatierung von Tyrosyl-Resten in Proteinen die häufigste posttranslationale Modifikation dieser Aminosäure ist. Bisher ist erst in wenigen Fällen geklärt, welchen Einfluss diese Modifikation auf die Eigenschaften der Proteine hat. In den Fällen, in denen dieser Einfluss geklärt werden konnte, zeigte sich, dass die sulfatierten Tyrosyl-Reste in vielen physiologisch notwendigen Abläufen eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören z. B. die effektive Abwehr von Pathogenen, die Blutgerinnung, die Entzündungshemmung und der Verdau von Nahrung. Über die Enzyme, die den Sulfuryl-Transfer auf Tyrosyl-Reste von Proteinen katalysieren, ist bisher wenig bekannt. Im ersten Teil der Arbeit wurden deshalb die Tyrosylprotein Sulfotransferasen physiologisch charakterisiert. Durch die Expression von *hTPST1*-GFP-Fusionsproteinen in COS-7-Zellen konnte die subzelluläre Lokalisation des Proteins geklärt werden. *hTPST1*-GFP wurde im Golgi-Apparat nachgewiesen. Bisher existierten dafür nur indirekte Beweise. Außerdem gelang die Beschreibung eines Regulators für die Expression beider TPST-Isoformen in den gefäßabschließenden Endothelzellen (HUVEC). Bei diesem Regulator handelt es sich um Schubspannung, die aufgrund des Blutflusses auf die Endothelzellen einwirkt. Bei geringer Schubspannung (entsprechend einem kapillären, venösen oder leicht arteriellen Blutfluss) liegt in HUVECs hauptsächlich TPST1 vor. Bei höherer Schubspannung (entsprechend dem venösen und arteriellen Blutfluss) wechselt die Isoform, es wird TPST2 verstärkt exprimiert. Dieser Wechsel der Isoformen induziert durch die Schubspannung ist zusätzlich zeitabhängig. Die Verringerung der TPST1-Expression erfolgt erst nach längerer Applikation des Stimulus. Die Expression von TPST2 in HUVECs wird bereits nach wenigen Stunden erhöht. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Regulation der Expression über verschiedene Signalkaskaden innerhalb der Endothelzelle verläuft. So wird die Verringerung der TPST1-Expression durch einen Inhibitor von Tyrosyl Kinasen verhindert. Die Steigerung der Expression von TPST2 bei höheren Schubspannungswerten wird vollständig durch die Zugabe eines PKC-Inhibitors unterdrückt. Dieser Isoform-Wechsel der TPSTs in Abhängigkeit vom Blutfluss könnte einen entscheidenden Einfluss auf die posttranslationale Modifikation ihrer Substrate haben, was sich danach wiederum auf die lebensnotwendigen physiologischen Prozesse,

in denen diese Substrate involviert sind, auswirkt. Der Versuch, TPST-Isoform-spezifische Substrate zu identifizieren, gelang aufgrund der bestehenden Versuchsanordnung nicht. Um dies *in vitro* zu ermöglichen, sollten im zweiten Teil dieser Arbeit beide Isoformen löslich, also ohne Transmembrandomäne, exprimiert werden. Für die folgenden Versuche wurde deshalb Hirudin als natürliches Substrat der TPSTs durch Primerligation und anschließender Expression und Reinigung des Proteins hergestellt. Außerdem wurde ein anti-*h*TPST1-Antikörper generiert. Dass die lösliche und aktive Expression von *h*TPSTs prinzipiell erreicht werden kann, wurde durch die Expression von *h*TPST1 Δ TMD in einem *E. coli in vitro*-System bewiesen. Die sich anschließende Expression löslicher *h*TPSTs in verschiedenen *E. coli*-Stämmen gelang aufgrund fehlender oder falsch-gebildeter Disulfidbrücken nicht. Eine Expression in Insektenzellen Sf21 fand nicht statt. In den Hefezellen *P. pastoris* X-33 wurden beide Isoformen in löslicher Form exprimiert. Es gelang die Anreicherung der Proteine mittels Immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC). In dem in der Literatur beschriebenen Aktivitätsassay für TPSTs zeigten beide Enzyme eine Bindung an PAPS, die auf die native Faltung der Proteine schließen lässt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Übertragung des Sulfuryl-Restes vom Donor PAPS auf das Akzeptor-Molekül Hirudin erfolgt. Damit standen am Ende der Arbeit beide *h*TPSTs löslich und aktiv zur Verfügung. In weiteren Arbeiten sollte die vollständige Aufreinigung der Proteine und die Identifizierung Isoform-spezifischer Substrate *in vitro* möglich sein. Dies würde zu einem besseren Verständnis der essentiellen physiologischen Vorgänge, die Ausgangspunkt dieser Arbeit waren, führen.

Ergänzende Tabellen

Tab.5 SULT-Nomenklatur, Synonyme und Genbank Einträge humaner Zytosolischer Sulfotransferasen. Die Tabelle wurde mit Hilfe von LocusLink, NCBI erstellt.

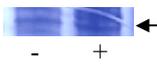
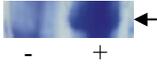
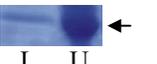
Bezeichnung	Synonyme	Genbank Eintrag	Referenz
SULT1A1	Phenol-Sulfotransferase	NM_001055, AJ007418	(Her <i>et al.</i> , 1996) (Raftogianis <i>et al.</i> , 1996)
	ST1A3	X78283	(Ozawa <i>et al.</i> , 1995)
	HAST1, Hpsta	L10819	(Zhu <i>et al.</i> , 1993b)
	HAST2	U09031, L19955	(Zhu <i>et al.</i> , 1993a)
	TS PST1	U52852	(Raftogianis <i>et al.</i> , 1996)
	P-PST	L19999	(Wilborn <i>et al.</i> , 1993)
	H-PST	U26309	(Hwang <i>et al.</i> , 1995)
	STP	X84654, U54701	(Jones <i>et al.</i> , 1995; Bernier <i>et al.</i> , 1996)
SULT1A2	Phenol-Sulfotransferase	NM_001054	(Her <i>et al.</i> , 1996)
	ST1A2	X78282	(Zhu <i>et al.</i> , 1993b; Ozawa <i>et al.</i> , 1995)
	HAST4V	U28169	(Zhu <i>et al.</i> , 1993a)
	HAST4	U28170	(Zhu <i>et al.</i> , 1993a)
	STP2	U33886	(Gaedigk <i>et al.</i> , 1997)
SULT1A3	Catecholamin Sulfotransferase	NM_003166	(Aksoy <i>et al.</i> , 1994)
	Dopamin Sulfotransferase	U20499	(Aksoy und Weinshilboum, 1995)
	ST1A5, hTLPST	L25275	(Bernier <i>et al.</i> , 1994)
	hEST	L19956	(Zhu <i>et al.</i> , 1993a)
	HAST3	U34199	Gaedigk A. & Grant M.D. 1995
	HAST5	U08032	(Aksoy <i>et al.</i> , 1994)
	TL PST STM	X84653, U37686	(Dooley <i>et al.</i> , 1994; Jones <i>et al.</i> , 1995)
SULT1A4	Phenol-Sulfotransferase, ST5A2	Z97055	Burgess J.1999
SULT1B1	ST1B1, ST1B2 Thyroidhormon Sulfotransferase	NM_014465 D89479, U95726	(Meinl und Glatt, 2001) (Fujita <i>et al.</i> , 1997) (Wang <i>et al.</i> , 1998)
	SULT1C1	Hydroxylamin Sulfotransferase, ST1C1	NM_001056 (Her <i>et al.</i> , 1997)
	SULT1C2	Hydroxylamin Sulfotransferase, SULT1C SULT2, ST1C3	NM_006588 (Sakakibara <i>et al.</i> , 1998)
SULT1E1	Östrogen Sulfotransferase, STE, EST	NM_005420	(Falany <i>et al.</i> , 1995)
SULT2A1	Hydroxysteroid Sulfotransferase, DHEA ST, STD, SULT2A3	NM_003167	(Otterness <i>et al.</i> , 1992)
SULT2B1	Hydroxysteroid Sulfotransferase, ST 2B1 (HSST2)	NM_004605	(Her <i>et al.</i> , 1998)

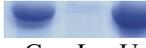
Tab.6 Humane Kohlenhydrat Sulfotransferasen: Nomenklatur, Synonyme und Genbank Einträge. Die Tabelle wurde mit Hilfe von LocusLink, NCBI erstellt.

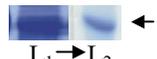
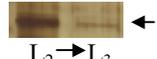
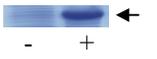
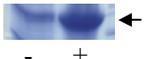
Bezeichnung	Synonyme	Genbank Einrag	Referenz
C4ST	Chondroitin 4-O-Sulfotransferase C4ST-1, HSA269537	NM_018413	(Yamauchi <i>et al.</i> , 2000)
C4S-2	Chondroitin 4-O-Sulfotransferase 2 C4ST-2	NM_018641	(Hiraoka <i>et al.</i> , 2000)
C4ST3	Chondroitin 4-O-Sulfotransferase 3	NM_152889	(Kang <i>et al.</i> , 2002)
CHST1	Kohlenhydrat (Keratansulfat Sulfotransferase 1 C6ST, KS6ST, KSGAL6ST, KSGal6ST	Gal-6) NM_003654	(Fukuta <i>et al.</i> , 1997)
CHST2	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 2 C6ST	6-O) NM_004267	(Uchimura <i>et al.</i> , 1998)
CHST3	Kohlenhydrat (Chondroitin 6) Sulfotransferase 3 C6ST, C6ST1, Chondroitin 6-Sulfotransferase	NM_004273	(Fukuta <i>et al.</i> , 1998)
CHST4	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 4 LSST, HEC-GlcNAC-6-ST, N-Acetylglucosamin 6-O-Sulfotransferase	6-O) NM_005769	(Bistrup <i>et al.</i> , 1999)
CHST5	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 5 I-GlcNAC-6-ST, N-Acetylglucosamin 6-O-Sulfotransferase	6-O) NM_012126	(Lee <i>et al.</i> , 1999)
CHST6	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 6 MCDC1, Macular-Dystrophy, Corneal, 1, Kohlenhydrate Sulfotransferase 6, Corneal N-Acetylglucosamin 6-Sulfotransferase	6-O) NM_021615	(Akama <i>et al.</i> , 2000)
CHST7	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 7 C6ST-2, Chondroitin 6-Sulfotransferase-2	6-O) NM_019886	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2000)
CHST8	Kohlenhydrat (N-Acetylglucosamin Sulfotransferase 8 GALNAC-4-ST1, N-Acetylgalactosamin-4-O-Sulfotransferase	4-O) NM_022467	(Xia <i>et al.</i> , 2000)
CST	Cerebroside (3'-Phosphoadenylylsulfat:Galactosylceramid Sulfotransferase Galactosylceramid Sulfotransferase, GalCer sulfotransferase	(3'-3') NM_004861	(Honke <i>et al.</i> , 1997)
D4ST-1	Dermatan-4-Sulfotransferase-1	NM_130468	(Evers <i>et al.</i> , 2001)
GAL3ST2	Beta-Galactose-3-O-Sulfotransferase 3 GAL3ST3	NM_033036	(Suzuki <i>et al.</i> , 2001)
GAL3ST-4	Beta-Galactose-3-O-Sulfotransferase 4, Hypothetisches Protein FLJ12116	NM_024637	(Seko <i>et al.</i> , 2001)
GALNAC4ST-2	GalNAc-4-Sulfotransferase 2 GALNAC-4-ST2, N-Acetylgalactosamin 4-O-Sulfotransferase 2	NM_031422	(Kang <i>et al.</i> , 2001)

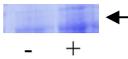
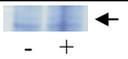
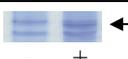
GALNAC4S-6ST	B cell RAG associated Protein BRAG, KIAA0598, N-Acetylgalactosamin 4-Sulfate, Gal 6-O-Sulfotransferase	NM_014863	(Verkoczy <i>et al.</i> , 1998)
GP3ST	Glycoprotein beta-Gal 3'-Sulfotransferase	NM_022134	(Honke <i>et al.</i> , 2001)
HNK-1ST	HNK-1 Sulfotransferase HNK1ST	NM_004854	(Ong <i>et al.</i> , 1998)
HS2ST1	Heparan Sulfat 2-O-Sulfotransferase 1 KIAA0448	NM_012262	(Rong <i>et al.</i> , 2000)
HS3ST1	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 1 3OST, 3OST1, Heparin-Glucosamin 3-O-Sulfotransferase	NM_005114	(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST2	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 2 3OST2, 3OST2, Heparin-Glucosamin 3-O-Sulfotransferase	NM_006043	(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST3A1	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3A1 3OST3A1, 3OST3A1, Heparin-Glucosamin 3-O-Sulfotransferase	NM_006042	(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST3A2	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3A2 3OST3A2		(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST3B1	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3B1 3OST3B1, 3OST3B1	NM_006041	(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST3B2	Heparan Sulfat D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase 3B2 3OST3B2		(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST4	Heparan Sulfat (Glucosamine) 3-O-Sulfotransferase 4 3OST4, 3OST4	XM_056254.	(Shworak <i>et al.</i> , 1999)
HS3ST5	Heparan Sulfat (Glucosamine) 3-O-Sulfotransferase 5		
HS6ST1	Heparan Sulfat 6-O-Sulfotransferase 1 HS6ST, Heparan-Sulfat 6-Sulfotransferase	NM_004807	(Habuchi <i>et al.</i> , 1998)
HS6ST2	Heparan Sulfat 6-O-Sulfotransferase 2 Heparan Sulfat 6-O-Sulfotransferase 2 Isoform S	NM_147174	(Habuchi <i>et al.</i> , 2000)
HS6ST3	Heparan Sulfat 6-O-Sulfotransferase 3	NM_153456	Bonner <i>et al.</i> 2002
NDST1	N-Deacetylase/N-Sulfotransferase (Heparan Glucosaminyl) 1 HSST, NST1, N-Deacetylase/N-Sulfotransferase, Heparan Sulfat-N-Deacetylase/N-Sulfotransferase	NM_001543	(Dixon <i>et al.</i> , 1995)
NDST2	N-Deacetylase/N-Sulfotransferase (Heparan Glucosaminyl) 2 NST2, HSST2, NCST2	NM_003635	(Humphries <i>et al.</i> , 1998)
NDST3	N-Deacetylase/N-Sulfotransferase (Heparan Glucosaminyl) 3	NM_004784	(Aikawa und Esko, 1999)
NDST4	N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 4	NM_022569	(Aikawa <i>et al.</i> , 2001)

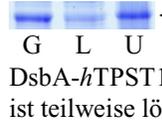
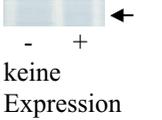
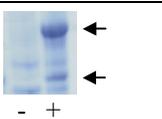
Tab.7 Expression von *hTPST1* und *hTPST2* Konstrukten in *E. coli*

Konstrukt M _w [Da]	Primer	Vektor, Schnitt- stellen	Expressions- Zellen	Zelldichte bei Induktion	Expres- sions- Tempe- ratur u. -Zeit	Expressions- Nachweis (- ohne IPTG; + mit IPTG)	Puffer für Aufschluss	Löslichkeits-Nachweis (G,Gesamt; L,Löslich; U, Unlöslich)
<i>h</i> TPST1ΔTMD 39684	TPST1- 07s TPST1- 06a	pET27b mod, Nco I Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,5 bis 0,8	22 °C, 1 h bis 2 h	 Keine Expr.		
					25 °C, 5 h		50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 G L U <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich
						0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 G L U <i>h</i> TPST1ΔTMD ist teilweise löslich	
					37 °C, 3 h		0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 G L U <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich
						50 mM Na-Acetat pH 4,5, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 G L U <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich	
						2 M Guanidinium HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT; Dialyse gegen: 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 G L U durch Puffer kaum zu erkennen  L U <i>h</i> TPST1ΔTMD präzipitiert langsam	

					<p>10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,3 M NaCl, 30 % (w/v) Glycerol, 10 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT</p> <p>Dialyse gegen: 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,02 (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT</p>	 ← G L U durch Puffer nicht zu erkennen	
<i>h</i> TPST2ΔTMD 39460	TPST2- 03s TPST2- 02a	pET27b mod, Nco I Eco RI	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,8 25 °C, 5 h	 ← - +	50 mM Tris/HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 ← G L U <i>h</i> TPST2ΔTMD ist unlöslich
						0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 ← G L U <i>h</i> TPST2ΔTMD ist unlöslich
				OD ₆₀₀ = 0,7 37 °C, bis 0,8 2 h	 ← - +	50 mM Tris/HCl pH 7,0, 250 mM Sucrose, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 ← G L U <i>h</i> TPST2ΔTMD ist unlöslich
						0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 ← G L U <i>h</i> TPST2ΔTMD ist teilweise löslich
Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD 56813	TPST1- 07s TPST1- 06a	pET32a, Nco I Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 1 30 °C, 2 h	 ← - +	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	 ← G L U Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich
						0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X- 100, 1 mM DTT	 ← G L U Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist teilweise löslich

		OD ₆₀₀ = 1,4 30 °C, 2,5 h		0,1 M Ethanolamin pH 9,5	 G L ₁ U ← Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist teilweise löslich		
				Dialyse gegen: 50 mM Tris/HCl pH 9,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl Dialyse gegen: 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 300 mM NaCl Dialyse gegen: 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 300 mM NaCl	 L ₁ → L ₂ ←  L ₂ → L ₃ ← Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD präzipitiert		
				0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 500 mM NaCl	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich		
	Origami (DE3)	OD ₆₀₀ = 0,4 30 °C, 2 h	 - + ←	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich		
				0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist kaum löslich		
Thx- <i>h</i> TPST2ΔTMD 56624	TPST2-03s Nco I, TPST2-02a Eco RI	pET32a,	BL21-CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 1 30 °C, 2 h	 - + ←	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST2ΔTMD ist unlöslich
				0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST2ΔTMD ist teilweise löslich		
	Origami (DE3)	OD ₆₀₀ = 0,4 30 °C, 2 h	 - + ← Vektor ist „leaky“	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	 G L U ← Thx- <i>h</i> TPST2ΔTMD ist unlöslich		

						0,1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ pH 11,0, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT	 ← G L U Thx- <i>h</i> TPST2ΔTMD ist kaum löslich
NusA- <i>h</i> TPST1ΔTMD 100329	TPST1- Sf01s TPST1- 02a	pET43a, Bam HI Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,8 30 °C, 2,5 h	 ← - + keine Expression		
			Rosetta (DE3) placi	OD ₆₀₀ = 0,6 37 °C, 2 h 4,5 h	 ← - 2h 4,5h keine Expression		
pE1B- <i>h</i> TPST1ΔTMD 42851	TPST1- 08s TPST1- 02a	pET27b, Bam HI Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,6 16 °C, bis 0,8 10 h	 ← - + keine Expression		
				OD ₆₀₀ = 0,8 30 °C, 2,5 h	 ← - + keine Expression	0,1 M Tris/HCl pH 7.0	 ← G L U pE1B- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich
DsbA- <i>h</i> TPST1ΔTMD 69520	TPST1- 08s TPST1- 02a	pET39b, Bam HI Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,6 16 °C, bis 0,8 10 h	 ← - + keine Expression		
				OD ₆₀₀ = 0,8 30 °C, 2,5 h 3 h	 ← - + L U DsbA- <i>h</i> TPST1ΔTM D ist nicht im Periplasma (L)	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	 ← G L U DsbA- <i>h</i> TPST1ΔTMD ist unlöslich
DsbC- <i>h</i> TPST1ΔTMD 72037	TPST1- 08s TPST1- 02a	pET40b, Bam HI Xho I	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	OD ₆₀₀ = 0,6 16 °C, bis 0,8 10 h	 ← - + keine Expression		

				<p>OD₆₀₀= 0,8 30 °C, 2,5 h 3 h</p>  <p>- + L U ← DsbC- <i>hTPST1ΔTM</i> D ist nicht im Periplasma (L)</p>	<p>50 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl</p>	 <p>G L U ← DsbA-<i>hTPST1ΔTM</i> ist teilweise löslich</p>
<i>hTPST2ΔTM</i> C8A 39464	TPST2 200060 1 CysN TPST2- 02a	pET27b mod, Nco I Eco RI	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	<p>OD₆₀₀= 0,6 30 °C, 4 h</p>  <p>- + ← keine Expression</p>		
<i>hTPST2Δ-</i> 42AA 37561	TPST2 200601 MetN TPST2- 02a	pET27b mod, Nco I Eco RI	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	<p>OD₆₀₀= 0,6 30 °C, 4 h</p>  <p>- + ← keine Expression</p>		
<i>hTPST1ΔTM</i> + Thx- <i>hTPST2ΔTM</i> 39684 + 56624	TPST1- 07s TPST1- 06a; TPST2- 03s TPST2- 02a	pET27b mod, Nco I Xho I; pET32a, Nco I Eco RI	BL21- CodonPlus (DE3) RIL	<p>OD₆₀₀= 1,6 37 °C, 3 h</p>  <p>- + ← ←</p>	<p>0,1 M Tris/HCl pH 7,0</p>	 <p>G L U ← <i>hTPST1ΔTM</i> und Thx-<i>hTPST2ΔTM</i> sind unlöslich</p>

Literatur

- Bac-N-Blue TM Transfection and Expression Guide, Version M. 2002. Karlsruhe, Invitrogen GmbH.
- Aikawa, J. und Esko, J.D. (1999). Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2690-2695.
- Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M. und Esko, J.D. (2001). Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5876-5882.
- Akama, T.O., Nishida, K., Nakayama, J., Watanabe, H., Ozaki, K., Nakamura, T., Dota, A., Kawasaki, S., Inoue, Y., Maeda, N., Yamamoto, S., Fujiwara, T., Thonar, E.J., Shimomura, Y., Kinoshita, S., Tanigami, A. und Fukuda, M.N. (2000). Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat. Genet.*, **26**, 237-241.
- Aksoy, I.A., Callen, D.F., Apostolou, S., Her, C. und Weinshilboum, R.M. (1994). Thermolabile phenol sulfotransferase gene (STM): localization to human chromosome 16p11.2. *Genomics*, **23**, 275-277.
- Aksoy, I.A. und Weinshilboum, R.M. (1995). Human thermolabile phenol sulfotransferase gene (STM): molecular cloning and structural characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 786-795.
- Arakawa, T., Bhat, R. und Timasheff, S.N. (1990). Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: the MgCl₂ system. *Biochemistry*, **29**, 1914-1923.
- Arakawa, T. und Timasheff, S.N. (1982). Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, **21**, 6545-6552.
- Arakawa, T. und Timasheff, S.N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, **23**, 5912-5923.
- Armstrong, J.I. und Bertozzi, C.R. (2000). *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **3**.
- Armstrong, N., de Lencastre, A. und Gouaux, E. (1999). A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.*, **8**, 1475-1483.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. [1-3]. 1994. New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Baeuerle, P.A. und Huttner, W.B. (1985). Tyrosine sulfation of yolk proteins 1, 2 und 3 in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6434-6439.
- Baeuerle, P.A. und Huttner, W.B. (1987). Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J. Cell Biol.*, **105**, 2655-2664.
- Barr, F.A. (1999). A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 381-384.
- Becker, E.L., Heinemann, H.O., Igarashi, K., Hodler, J.E. und Gershberg, H. (1960). Renal Mechanisms for the Excretion of Inorganic Sulfate in Man. *Journal of Clinical Investigation*, **39**, 1909-1913.

- Beisswanger,R., Corbeil,D., Vannier,C., Thiele,C., Dohrmann,U., Kellner,R., Ashman,K., Niehrs,C. und Huttner,W.B. (1998). Existence of distinct tyrosylprotein sulfotransferase genes: molecular characterization of tyrosylprotein sulfotransferase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11134-11139.
- Berglund,F. (1960). Transport of inorganic sulfate by the renal tubules. *Acta Physiol. Scand.*, **49**, 1-37.
- Bernier,F., Lopez,S., I, Labrie,F. und Luu-The,V. (1994). Cloning and expression of cDNA encoding human placental estrogen sulfotransferase. *Mol. Cell Endocrinol.*, **99**, R11-R15.
- Bernier,F., Soucy,P. und Luu-The,V. (1996). Human phenol sulfotransferase gene contains two alternative promoters: Structure and expression of the gene. *DNA Cell Biol.*, **15**, 367-375.
- Bidwell,L.M., McManus,M.E., Gaedigk,A., Kakuta,Y., Negishi,M., Pedersen,L. und Martin,J.L. (1999). Crystal structure of human catecholamine sulfotransferase. *J. Mol. Biol.*, **293**, 521-530.
- Bistrup,A., Bhakta,S., Lee,J.K., Belov,Y.Y., Gunn,M.D., Zuo,F.R., Huang,C.C., Kannagi,R., Rosen,S.D. und Hemmerich,S. (1999). Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J. Cell Biol.*, **145**, 899-910.
- Boettner,M., Prinz,B., Holz,C., Stahl,U. und Lang,C. (2002). High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **99**, 51-62.
- Borges,E., Eytner,R., Moll,T., Steegmaier,M., Campbell,M.A., Ley,K., Mossmann,H. und Vestweber,D. (1997). The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*, **90**, 1934-1942.
- Bowman,K.G. und Bertozzi,C.R. (1999). Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chem. Biol.*, **6**, R9-R22.
- Bradford,M.H. (1976). A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **205**, 22-26.
- Buckholz,R.G. und Gleeson,M.A. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N. Y.)*, **9**, 1067-1072.
- Butenas,S., van, V und Mann,K.G. (1997). Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21527-21533.
- Castranova,V., Weise,M.J. und Hoffman,J.F. (1979). Characteristics of anion transport in cat and dog red blood cells. *J. Membr. Biol.*, **49**, 57-74.
- Chirgwin,J.M., Przybyla,A.E., MacDonald,R.J. und Rutter,W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299.
- Choe,H., Farzan,M., Sun,Y., Sullivan,N., Rollins,B., Ponath,P.D., Wu,L., Mackay,C.R., LaRosa,G., Newman,W., Gerard,N., Gerard,C. und Sodroski,J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, **85**, 1135-1148.
- Clare,J.J., Rayment,F.B., Ballantine,S.P., Sreekrishna,K. und Romanos,M.A. (1991a). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N. Y.)*, **9**, 455-460.
- Clare,J.J., Romanos,M.A., Rayment,F.B., Rowedder,J.E., Smith,M.A., Payne,M.M., Sreekrishna,K. und Henwood,C.A. (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, **105**, 205-212.

- Clemetson, K.J. (1999). Primary haemostasis: sticky fingers cement the relationship. *Curr. Biol.*, **9**, R110-R112.
- Cole, P.A. (1996). Chaperone-assisted protein expression. *Structure.*, **4**, 239-242.
- Costagliola, S., Panneels, V., Bonomi, M., Koch, J., Many, M.C., Smits, G. und Vassart, G. (2002). Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J.*, **21**, 504-513.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. und Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)*, **11**, 905-910.
- Curtis, C.G. (1982). The origins of intracellular sulphate for conjugation reactions. In Mulder, G.J., Caldwell, J., Van Kempen, G.M.J. und Vonk, R.J. (Eds.), *Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugation.*, Taylor & Francis Ltd., London, pp. 67-71.
- Dajani, R., Cleasby, A., Neu, M., Wonacott, A.J., Jhoti, H., Hood, A.M., Modi, S., Hersey, A., Taskinen, J., Cooke, R.M., Manchee, G.R. und Coughtrie, M.W. (1999a). X-ray crystal structure of human dopamine sulfotransferase, SULT1A3. Molecular modeling and quantitative structure-activity relationship analysis demonstrate a molecular basis for sulfotransferase substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37862-37868.
- Dajani, R., Sharp, S., Graham, S., Bethell, S.S., Cooke, R.M., Jamieson, D.J. und Coughtrie, M.W. (1999b). Kinetic properties of human dopamine sulfotransferase (SULT1A3) expressed in prokaryotic and eukaryotic systems: comparison with the recombinant enzyme purified from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, **16**, 11-18.
- Darby, N.J., Freedman, R.B. und Creighton, T.E. (1994). Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: catalysis of disulfide bond formation in a model peptide. *Biochemistry*, **33**, 7937-7947.
- Davies, P.F., Barbee, K.A., Volin, M.V., Robotewskyj, A., Chen, J., Joseph, L., Griem, M.L., Wernick, M.N., Jacobs, E., Polacek, D.C., dePaola, N. und Barakat, A.I. (1997). Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, 527-549.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. und Harrison, R.G. (1998). Soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using the NusA expression system. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **216**, U274.
- De Luca, M., Dunlop, L.C., Andrews, R.K., Flannery, J.V., Jr., Ettling, R., Cumming, D.A., Veldman, G.M. und Berndt, M.C. (1995). A novel cobra venom metalloproteinase, mocarhagin, cleaves a 10-amino acid peptide from the mature N terminus of P-selectin glycoprotein ligand receptor, PSGL-1 und abolishes P-selectin binding. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26734-26737.
- Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D. und Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**, 1744-1747.
- Dixon, J., Loftus, S.K., Gladwin, A.J., Scambler, P.J., Wasmuth, J.J. und Dixon, M.J. (1995). Cloning of the human heparan sulfate-N-deacetylase/N-sulfotransferase gene from the Treacher Collins syndrome candidate region at 5q32-q33.1. *Genomics*, **26**, 239-244.
- Dong, J.F., Li, C.Q. und Lopez, J.A. (1994). Tyrosine sulfation of the glycoprotein Ib-IX complex: identification of sulfated residues and effect on ligand binding. *Biochemistry*, **33**, 13946-13953.
- Dooley, T.P., Probst, P., Munroe, P.B., Mole, S.E., Liu, Z. und Doggett, N.A. (1994). Genomic organization and DNA sequence of the human catecholamine-sulfating phenol sulfotransferase gene (STM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1325-1332.

- Doranz,B.J., Rucker,J., Yi,Y., Smyth,R.J., Samson,M., Peiper,S.C., Parmentier,M., Collman,R.G. und Doms,R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 und CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, **85**, 1149-1158.
- Duffel,M.W. (1997). *Comprehensive Toxicology*, . Elsevier, Oxford, pp. 365-383.
- Evers,M.R., Xia,G., Kang,H.G., Schachner,M. und Baenziger,J.U. (2001). Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36344-36353.
- Falany,C.N. (1991). Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 255-259.
- Falany,C.N. (1997a). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, **11**, 206-216.
- Falany,C.N. (1997b). Sulfation and sulfotransferases. Introduction: changing view of sulfation and the cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, **11**, 1-2.
- Falany,C.N., Krasnykh,V. und Falany,J.L. (1995). Bacterial expression and characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 529-539.
- Farzan,M., Mirzabekov,T., Kolchinsky,P., Wyatt,R., Cayabyab,M., Gerard,N.P., Gerard,C., Sodroski,J. und Choe,H. (1999). Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, **96**, 667-676.
- Franzon,V.L., Gibson,M.A., Hatzinikolas,G., Woollatt,E., Sutherland,G.R. und Cleary,E.G. (1999). Molecular cloning of a novel human PAPS synthetase which is differentially expressed in metastatic and non-metastatic colon carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 613-626.
- Frey, M. D. und Radola, B. J. Electrophoresis. 3. 1982.
- Frick,A., Durasin,I. und Neuweg,M. (1984). Reabsorption of inorganic sulfate in the rat kidney: evidence for an adaptive depression of TmSO₄ during SO₄ loading. *Pflugers Arch.*, **402**, 433-438.
- Fryxell,K.B., O'Donoghue,K., Graeff,R.M., Lee,H.C. und Branton,W.D. (1995). Functional expression of soluble forms of human CD38 in Escherichia coli and Pichia pastoris. *Protein Expr. Purif.*, **6**, 329-336.
- Fujita,K., Nagata,K., Ozawa,S., Sasano,H. und Yamazoe,Y. (1997). Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 1052-1061.
- Fukuta,M., Inazawa,J., Torii,T., Tsuzuki,K., Shimada,E. und Habuchi,O. (1997). Molecular cloning and characterization of human keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32321-32328.
- Fukuta,M., Kobayashi,Y., Uchimura,K., Kimata,K. und Habuchi,O. (1998). Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1399**, 57-61.
- Gaedigk,A., Beatty,B.G. und Grant,D.M. (1997). Cloning, structural organization und chromosomal mapping of the human phenol sulfotransferase STP2 gene. *Genomics*, **40**, 242-246.
- Gimbrone,M.A., Jr., Topper,J.N., Nagel,T., Anderson,K.R. und Garcia-Cardena,G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces und atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **902**, 230-239.
- Girard,J.P., Baekkevold,E.S. und Amalric,F. (1998). Sulfation in high endothelial venules: cloning und expression of the human PAPS synthetase. *FASEB J.*, **12**, 603-612.

- Griffith,K.J., Chan,E.K., Lung,C.C., Hamel,J.C., Guo,X., Miyachi,K. und Fritzler,M.J. (1997). Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **40**, 1693-1702.
- Habuchi,H., Kobayashi,M. und Kimata,K. (1998). Molecular characterization and expression of heparan-sulfate 6-sulfotransferase. Complete cDNA cloning in human and partial cloning in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9208-9213.
- Habuchi,H., Tanaka,M., Habuchi,O., Yoshida,K., Suzuki,H., Ban,K. und Kimata,K. (2000). The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2859-2868.
- Habuchi,O. (2000). Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 115-127.
- Hemmerich,S. (2001). Carbohydrate sulfotransferases: novel therapeutic targets for inflammation, viral infection and cancer. *Drug Discov. Today*, **6**, 27-35.
- Her,C., Kaur,G.P., Athwal,R.S. und Weinshilboum,R.M. (1997). Human sulfotransferase SULT1C1: cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization. *Genomics*, **41**, 467-470.
- Her,C., Raftogianis,R. und Weinshilboum,R.M. (1996). Human phenol sulfotransferase STP2 gene: molecular cloning, structural characterization, and chromosomal localization. *Genomics*, **33**, 409-420.
- Her,C., Wood,T.C., Eichler,E.E., Mohrenweiser,H.W., Ramagli,L.S., Siciliano,M.J. und Weinshilboum,R.M. (1998). Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics*, **53**, 284-295.
- Heukeshoven,J. und Dernick,R. (1985). Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **326**, 91-101.
- Hille,A., Braulke,T., von Figura,K. und Huttner,W.B. (1990). Occurrence of tyrosine sulfate in proteins--a balance sheet. 1. Secretory and lysosomal proteins. *Eur. J. Biochem.*, **188**, 577-586.
- Hiraoka,N., Nakagawa,H., Ong,E., Akama,T.O., Fukuda,M.N. und Fukuda,M. (2000). Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 20188-20196.
- Hiraoka,N., Petryniak,B., Nakayama,J., Tsuboi,S., Suzuki,M., Yeh,J.C., Izawa,D., Tanaka,T., Miyasaka,M., Lowe,J.B. und Fukuda,M. (1999). A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity*, **11**, 79-89.
- Hobkirk,R. (1993). Steroid Sulfation - Current Concepts. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **4**, 69-74.
- Honke,K., Tsuda,M., Hirahara,Y., Ishii,A., Makita,A. und Wada,Y. (1997). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4864-4868.
- Honke,K., Tsuda,M., Koyota,S., Wada,Y., Iida-Tanaka,N., Ishizuka,I., Nakayama,J. und Taniguchi,N. (2001). Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal-3'-sulfotransferase that acts on both type 1 and type 2 (Gal beta 1-3/1-4GlcNAc-R) oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **276**, 267-274.

- Hortin,G.L. (1990). Sulfation of tyrosine residues in coagulation factor V. *Blood*, **76**, 946-952.
- Humphries,D.E., Lanciotti,J. und Karlinsky,J.B. (1998). cDNA cloning, genomic organization and chromosomal localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase-2. *Biochem. J.*, **332 (Pt 2)**, 303-307.
- Humphries,D.E., Silbert,C.K. und Silbert,J.E. (1986). Glycosaminoglycan production by bovine aortic endothelial cells cultured in sulfate-depleted medium. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9122-9127.
- Humphries,D.E., Sullivan,B.M., Aleixo,M.D. und Stow,J.L. (1997). Localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase to the trans-Golgi network. *Biochem. J.*, **325 (Pt 2)**, 351-357.
- Huttner,W.B. (1982). Sulphation of tyrosine residues-a widespread modification of proteins. *Nature*, **299**, 273-276.
- Hwang,C., Sinskey,A.J. und Lodish,H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, **257**, 1496-1502.
- Hwang,S.R., Kohn,A.B. und Hook,V.Y. (1995). Molecular cloning of an isoform of phenol sulfotransferase from human brain hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 701-707.
- Jaffe,E.A., Nachman,R.L., Becker,C.G. und Minick,C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2745-2756.
- Johnson,P., Maiti,A., Brown,K.L. und Li,R. (2000). A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 455-465.
- Jones,A.L., Hagen,M., Coughtrie,M.W., Roberts,R.C. und Glatt,H. (1995). Human platelet phenolsulfotransferases: cDNA cloning, stable expression in V79 cells and identification of a novel allelic variant of the phenol-sulfating form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 855-862.
- Kakuta,Y., Pedersen,L.G., Carter,C.W., Negishi,M. und Pedersen,L.C. (1997). Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 904-908.
- Kakuta,Y., Pedersen,L.G., Pedersen,L.C. und Negishi,M. (1998). Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 129-130.
- Kakuta,Y., Sueyoshi,T., Negishi,M. und Pedersen,L.C. (1999). Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulphotransferase 1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10673-10676.
- Kang,H.G., Evers,M.R., Xia,G., Baenziger,J.U. und Schachner,M. (2001). Molecular cloning and expression of an N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase that transfers sulfate to terminal and non-terminal beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10861-10869.
- Kang,H.G., Evers,M.R., Xia,G., Baenziger,J.U. und Schachner,M. (2002). Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34766-34772.
- Kasinathan,C., Ramaprasad,P., William,S. und Espina,N. (1998). Stimulation of tyrosylprotein sulfotransferase activity by ethanol: role of increased enzyme level. *Alcohol*, **15**, 271-276.

- Kehoe, J.W. und Bertozzi, C.R. (2000). Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem. Biol.*, **7**, R57-R61.
- Kehoe, J.W., Maly, D.J., Verdugo, D.E., Armstrong, J.I., Cook, B.N., Ouyang, Y.B., Moore, K.L., Ellman, J.A. und Bertozzi, C.R. (2002). Tyrosylprotein sulfotransferase inhibitors generated by combinatorial target-guided ligand assembly. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 329-332.
- Kiehlbauch, C.C., Lam, Y.F. und Ringer, D.P. (1995). Homodimeric and heterodimeric aryl sulfotransferases catalyze the sulfuric acid esterification of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18941-18947.
- Kitagawa, H., Fujita, M., Ito, N. und Sugahara, K. (2000). Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 21075-21080.
- Kjer-Nielsen, L., Teasdale, R.D., van Vliet, C. und Gleeson, P.A. (1999). A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 385-388.
- Klaassen, C.D. und Boles, J.W. (1997). Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J.*, **11**, 404-418.
- Klose, J. Humangenetik. 26, 231-243. 1975.
- Krijgsheld, K.R., Frankena, H., Scholtens, E., Zweens, J. und Mulder, G.J. (1979). Absorption, serum levels and urinary excretion of inorganic sulfate after oral administration of sodium sulfate in the conscious rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 492-500.
- Krüger, N.J. (1994). The Bradford Method for Protein Quantification. *Meth. Mol. Biol.*, **32**, 9-15.
- Kurima, K., Warman, M.L., Krishnan, S., Domowicz, M., Krueger, R.C., Jr., Deyrup, A. und Schwartz, N.B. (1998). A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8681-8685.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Lin, C.C., Stark, A., Love, H.D., Ostermann, J. und Nilsson, T. (1999). GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *EMBO J.*, **18**, 4935-4948.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. und McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N. Y.)*, **11**, 187-193.
- Lee, J.K., Bhakta, S., Rosen, S.D. und Hemmerich, S. (1999). Cloning and characterization of a mammalian N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase that is highly restricted to intestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 543-549.
- Lee, R.W. und Huttner, W.B. (1983). Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11326-11334.

- Leyh, T.S. (1993). The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 515-542.
- Leyte, A., van Schijndel, H.B., Niehrs, C., Huttner, W.B., Verbeet, M.P., Mertens, K. und van Mourik, J.A. (1991). Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 740-746.
- Li, H., Deyrup, A., Mensch, J.R., Jr., Domowicz, M., Konstantinidis, A.K. und Schwartz, N.B. (1995). The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29453-29459.
- Li, X., Tu, L., Murphy, P.G., Kadono, T., Steeber, D.A. und Tedder, T.F. (2001). CHST1 and CHST2 sulfotransferase expression by vascular endothelial cells regulates shear-resistant leukocyte rolling via L-selectin. *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 565-574.
- Lilie, H., Schwarz, E. und Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 497-501.
- Lucke, H., Stange, G. und Murer, H. (1981). Sulfate-sodium cotransport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum. *Gastroenterology*, **80**, 22-30.
- Meh, D.A., Siebenlist, K.R., Brennan, S.O., Holyst, T. und Mosesson, M.W. (2001). The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb. Haemost.*, **85**, 470-474.
- Meinl, W. und Glatt, H. (2001). Structure and localization of the human SULT1B1 gene: neighborhood to SULT1E1 and a SULT1D pseudogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 855-862.
- Molhoj, M., Ulvskov, P. und Dal Degan, F. (2001). Characterization of a functional soluble form of a Brassica napus membrane-anchored endo-1,4-beta-glucanase heterologously expressed in Pichia pastoris. *Plant Physiol*, **127**, 674-684.
- Mulder, G.J. und Jakoby, W.B. (1990). Sulfation. In Mulder, G.J. (Ed.), *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*, Taylor & Francis Ltd., New-York, pp. 107-161.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E. und Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410**, 50-56.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Munro, S. (1998). Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.*, **8**, 11-15.
- Murer, H. und Burckhardt, G. (1983). Membrane transport of anions across epithelia of mammalian small intestine and kidney proximal tubule. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, **96**, 1-51.
- Negishi, M., Pedersen, L.G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. und Pedersen, L.C. (2001). Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**, 149-157.
- Nicholas, H.B., Jr., Chan, S.S. und Rosenquist, G.L. (1999). Reevaluation of the determinants of tyrosine sulfation. *Endocrine.*, **11**, 285-292.
- Niehrs, C., Beisswanger, R. und Huttner, W.B. (1994). Protein tyrosine sulfation, 1993--an update. *Chem. Biol. Interact.*, **92**, 257-271.

- Niehrs,C. und Huttner,W.B. (1990a). Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBO J.*, **9**, 35-42.
- Niehrs,C., Huttner,W.B., Carvallo,D. und Degryse,E. (1990b). Conversion of recombinant hirudin to the natural form by in vitro tyrosine sulfation. Differential substrate specificities of leech and bovine tyrosylprotein sulfotransferases. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9314-9318.
- Norman,K.E., Moore,K.L., McEver,R.P. und Ley,K. (1995). Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, **86**, 4417-4421.
- O'Farrell,P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
- Ong,E., Yeh,J.C., Ding,Y., Hindsgaul,O. und Fukuda,M. (1998). Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5190-5195.
- Otterness,D.M., Wieben,E.D., Wood,T.C., Watson,W.G., Madden,B.J., McCormick,D.J. und Weinsilbourn,R.M. (1992). Human liver dehydroepiandrosterone sulfotransferase: molecular cloning and expression of cDNA. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 865-872.
- Ouyang,Y., Lane,W.S. und Moore,K.L. (1998a). Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 2896-2901.
- Ouyang,Y.B., Crawley,J.T., Aston,C.E. und Moore,K.L. (2002). Reduced body weight and increased postimplantation fetal death in tyrosylprotein sulfotransferase-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, **277**, 23781-23787.
- Ouyang,Y.B. und Moore,K.L. (1998b). Molecular cloning and expression of human and mouse tyrosylprotein sulfotransferase-2 and a tyrosylprotein sulfotransferase homologue in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24770-24774.
- Ozawa,S., Nagata,K., Shimada,M., Ueda,M., Tsuzuki,T., Yamazoe,Y. und Kato,R. (1995). Primary structures and properties of two related forms of aryl sulfotransferases in human liver. *Pharmacogenetics*, **5 Spec No**, S135-S140.
- Patel,K.D., Moore,K.L., Nollert,M.U. und McEver,R.P. (1995). Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1887-1896.
- Pedersen,L.C., Petrotchenko,E., Shevtsov,S. und Negishi,M. (2002). Crystal structure of the human estrogen sulfotransferase-PAPS complex: evidence for catalytic role of Ser137 in the sulfuryl transfer reaction. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17928-17932.
- Pedersen,L.C., Petrotchenko,E.V. und Negishi,M. (2000). Crystal structure of SULT2A3, human hydroxysteroid sulfotransferase. *FEBS Lett.*, **475**, 61-64.
- Petrotchenko,E.V., Pedersen,L.C., Borchers,C.H., Tomer,K.B. und Negishi,M. (2001). The dimerization motif of cytosolic sulfotransferases. *FEBS Lett.*, **490**, 39-43.
- Pouyani,T. und Seed,B. (1995). PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*, **83**, 333-343.
- Rabiller, M. Bioinformatical and biochemical charactersation of Tyrosylprotein Sulfotransferase 1. 1-33. 2002. MPI fuer molekulare Physiologie.

- Raftogianis,R.B., Her,C. und Weinshilboum,R.M. (1996). Human phenol sulfotransferase pharmacogenetics: STP1 gene cloning and structural characterization. *Pharmacogenetics*, **6**, 473-487.
- Ramaprasad,P. und Kasinathan,C. (1998a). In vivo induction of tyrosylprotein sulfotransferase by ethanol: role of increased enzyme synthesis. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **22**, 1120-1124.
- Ramaprasad,P. und Kasinathan,C. (1998b). Isolation of tyrosylprotein sulfotransferase from rat liver. *General Pharmacology*, **30**, 555-559.
- Robbins,P.W. und Lipmann,F. (1958). Separation of the 2 Enzymatic Phases in Active Sulfate Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **233**, 681-685.
- Rodgers,S.D., Camphausen,R.T. und Hammer,D.A. (2001). Tyrosine sulfation enhances but is not required for PSGL-1 rolling adhesion on P-selectin. *Biophys. J.*, **81**, 2001-2009.
- Romanos,M.A., Clare,J.J., Beesley,K.M., Rayment,F.B., Ballantine,S.P., Makoff,A.J., Dougan,G., Fairweather,N.F. und Charles,I.G. (1991). Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine*, **9**, 901-906.
- Rong,J., Habuchi,H., Kimata,K., Lindahl,U. und Kusche-Gullberg,M. (2000). Expression of heparan sulphate L-iduronyl 2-O-sulphotransferase in human kidney 293 cells results in increased D-glucuronyl 2-O-sulphation. *Biochem. J.*, **346 Pt 2**, 463-468.
- Rosenberg,R.D., Shworak,N.W., Liu,J., Schwartz,J.J. und Zhang,L. (1997). Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.*, **99**, 2062-2070.
- Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126.
- Roth,J.A. (1986). Sulfoconjugation - Role in Neurotransmitter and Secretory Protein-Activity. *Trends in Pharmacological Sciences*, **7**, 404-407.
- Rudolph,R. und Lilie,H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, **10**, 49-56.
- Sadler,J.E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 395-424.
- Sakakibara, Y., Yanagisawa,K., Katafuchi,J., Ringer,D.P., Takami,Y., Nakayama,T., Suiko,M. und Liu,M.C. (1998). Molecular cloning, expression und characterization of novel human SULT1C sulfotransferases that catalyze the sulfonation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33929-33935.
- Sako,D., Comess,K.M., Barone,K.M., Camphausen,R.T., Cumming,D.A. und Shaw,G.D. (1995). A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell*, **83**, 323-331.
- Salmivirta,M., Lidholt,K. und Lindahl,U. (1996). Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J.*, **10**, 1270-1279.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. third Edition. 2001. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Sarre,S., Gessler,U. und Seybold,D. (1988). Der renale Transport einzelner Substanzen. In Sarre,S., Gessler,U. und Seybold,D. (Eds.), *Nierenkrankheiten*, . Georg Thieme Verlag, Stuttgart-NewYork, pp. 26-41.

- Savage,B., Almus-Jacobs,F. und Ruggeri,Z.M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, **94**, 657-666.
- Scorer,C.A., Buckholz,R.G., Clare,J.J. und Romanos,M.A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **136**, 111-119.
- Sdougos,H.P., Bussolari,S.R. und Dewey,C.F. (1984). Secondary Flow and Turbulence in A Cone-And-Plate Device. *Journal of Fluid Mechanics*, **138**, 379-404.
- Seibert,C., Cadene,M., Sanfiz,A., Chait,B.T. und Sakmar,T.P. (2002). Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11031-11036.
- Seko,A., Hara-Kuge,S. und Yamashita,K. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel human galactose 3-O-sulfotransferase that transfers sulfate to gal beta 1->3galNAc residue in O-glycans. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25697-25704.
- Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O. und Mann,M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
- Shworak,N.W., Liu,J., Fritze,L.M., Schwartz,J.J., Zhang,L., Logeart,D. und Rosenberg,R.D. (1997). Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28008-28019.
- Shworak,N.W., Liu,J., Petros,L.M., Zhang,L., Kobayashi,M., Copeland,N.G., Jenkins,N.A. und Rosenberg,R.D. (1999). Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5170-5184.
- Smith,J.T. und Jakoby,W.B. (1983). An effect of dietary sulfur on liver inorganic sulfate in the rat. *Am. Nutr. Metab.*, **27**, 345-348.
- Sousa,V.L., Costa,M.T., Palma,A.S., Enguita,F. und Costa,J. (2001). Localization, purification and specificity of the full-length membrane-bound form of human recombinant alpha 1,3/4-fucosyltransferase from BHK-21B cells. *Biochem. J.*, **357**, 803-810.
- Storrie,B., Pepperkok,R. und Nilsson,T. (2000). Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling. *Trends Cell Biol.*, **10**, 385-391.
- Strott,C.A. (1996). Steroid sulfotransferases. *Endocr. Rev.*, **17**, 670-697.
- Suiko,M. und Liu,M.C. (1988). Change in binding affinities of 3Y1 secreted fibronectin upon desulfation of tyrosine-O-sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 1094-1098.
- Summers,M.D. und Smith,G.E. (1987). A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell-Culture Procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*, 1-56.
- Superti-Furga,A. (1994). A defect in the metabolic activation of sulfate in a patient with achondrogenesis type IB. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**, 1137-1145.
- Suzuki,A., Hiraoka,N., Suzuki,M., Angata,K., Misra,A.K., McAuliffe,J., Hindsgaul,O. und Fukuda,M. (2001). Molecular cloning and expression of a novel human beta-Gal-3-O-sulfotransferase that acts preferentially on N-acetylglucosamine in N- and O-glycans. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24388-24395.

- Tang, J.G., Wang, C.C. und Tsou, C.L. (1988). Formation of native insulin from the scrambled molecule by protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.*, **255**, 451-455.
- Togawa, T., Tanabe, S., Kato, M., Koshiishi, I., Toida, T. und Imanari, T. (1990). Metabolic Pathways of Sodium Bisulfite Injected Intravenously in Rabbits. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **13**, 83-89.
- Topper, J.N. und Gimbrone, M.A., Jr. (1999). Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today*, **5**, 40-46.
- Traub, O. und Berk, B.C. (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 677-685.
- Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., Yamamura, K., Ozaki, T., Nakagawara, A., Kadomatsu, K. und Muramatsu, T. (1998). Human N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **124**, 670-678.
- ul Haque, M.F., King, L.M., Krakow, D., Cantor, R.M., Rusiniak, M.E., Swank, R.T., Superti-Furga, A., Haque, S., Abbas, H., Ahmad, W., Ahmad, M. und Cohn, D.H. (1998). Mutations in orthologous genes in human spondyloepimetaphyseal dysplasia and the brachymorphic mouse. *Nat. Genet.*, **20**, 157-162.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G. und Kloss, S. (1985a). Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. II. Specificity: sulfate-ester, sulfonates and amino sulfonates. *Pflugers Arch.*, **404**, 293-299.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G. und Kloss, S. (1985b). Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. III. Specificity: disulfonates, di- and tri-carboxylates and sulfocarboxylates. *Pflugers Arch.*, **404**, 300-306.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G. und Kloss, S. (1985c). Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. IV. Specificity: salicylate analogs. *Pflugers Arch.*, **404**, 307-310.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G., Kloss, S. und Lang, H.J. (1985d). Contraluminal sulfate transport in the proximal tubule of the rat kidney. V. Specificity: phenolphthaleins, sulfonphthaleins, and other sulfo dyes, sulfamoyl-compounds and diphenylamine-2-carboxylates. *Pflugers Arch.*, **404**, 311-318.
- Vargas, F., Frerot, O., Brion, F., Trung, T., Lafitte, A. und Gulat-Marnay, C. (1994). 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate biosynthesis and the sulfation of cholecystokinin by the tyrosylprotein-sulfotransferase in rat brain tissue. *Chem. Biol. Interact.*, **92**, 281-291.
- Verkoczy, L.K., Marsden, P.A. und Berinstein, N.L. (1998). hBRAG, a novel B cell lineage cDNA encoding a type II transmembrane glycoprotein potentially involved in the regulation of recombination activating gene 1 (RAG1). *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2839-2853.
- Wang, J., Falany, J.L. und Falany, C.N. (1998). Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver. *Mol. Pharmacol.*, **53**, 274-282.
- Wei, C., Tang, B., Zhang, Y. und Yang, K. (1999). Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem. J.*, **340 (Pt 1)**, 345-351.
- Weinshilboum, R.M. und Otterness, D.M. (1994). Sulfotransferase enzymes. In Kaufmann, F.C. (Ed.), *Conjugation - Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity*, . Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 45-78.

- Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M., Aksoy, I.A., Wood, T.C., Her, C. und Raftogianis, R.B. (1997). Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.*, **11**, 3-14.
- Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H. und Reilander, H. (1995). Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.*, **377**, 451-456.
- Wilborn, T.W., Comer, K.A., Dooley, T.P., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L. und Falany, C.N. (1993). Sequence analysis and expression of the cDNA for the phenol-sulfating form of human liver phenol sulfotransferase. *Mol. Pharmacol.*, **43**, 70-77.
- Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P. und Cummings, R.D. (1995). Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22677-22680.
- William, S., Ramaprasad, P. und Kasinathan, C. (1997). Purification of tyrosylprotein sulfotransferase from rat submandibular salivary glands. *Arch. Biochem. Biophys.*, **338**, 90-96.
- Xia, G., Evers, M.R., Kang, H.G., Schachner, M. und Baenziger, J.U. (2000). Molecular cloning and expression of the pituitary glycoprotein hormone N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 38402-38409.
- Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K. und Habuchi, O. (2000). Molecular cloning and expression of chondroitin 4-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8975-8981.
- Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S. und Kato, R. (1994). Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.*, **92**, 107-117.
- Yang, J., Hirata, T., Croce, K., Merrill-Skoloff, G., Tchernychev, B., Williams, E., Flaumenhaft, R., Furie, B.C. und Furie, B. (1999). Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J. Exp. Med.*, **190**, 1769-1782.
- Zhou, M., Rehse, P., Chang, H.J., Luu-The, V. und Lin, S.X. (2001). Crystallization and preliminary crystallographic results of apo and complex forms of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**, 1630-1633.
- Zhu, X., Veronese, M.E., Bernard, C.C., Sansom, L.N. und McManus, M.E. (1993a). Identification of two human brain aryl sulfotransferase cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 120-127.
- Zhu, X., Veronese, M.E., Sansom, L.N. und McManus, M.E. (1993b). Molecular characterisation of a human aryl sulfotransferase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 671-676.
- Zlotnik, A., Morales, J. und Hedrick, J.A. (1999). Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev. Immunol.*, **19**, 1-47.

Danksagung

Diese Arbeit konnte nur durch die Unterstützung vieler begeisterter Kollegen und Freunde gelingen. Besonders danke ich ...

... PD Dr. Peter Bayer, dass er mir dieses Thema anvertraute, mich unterstützte, mit mir diskutierte und mir alle meine Launen durchgehen ließ (sowohl die guten als auch die weniger guten).

... Prof. H. Waldmann für die komplikationslose offizielle Betreuung meiner Dissertation auf Seiten des Fachbereiches Chemie der Universität Dortmund.

... PD Dr. Henning Morawietz und Winfried Göttlich (Institut für Pathophysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Kooperation, die von beiden sehr enthusiastisch vorangetrieben wurde.

... Britta Hollinderbäumer für die Einführung in die Insektenzellkultur und die vielen privaten Gespräche, die mir gezeigt haben, dass ich doch nicht das Unmögliche will (oder zumindest nicht alleine).

... Stephan Schilling (Probiodrug AG) für die vielen Tipps und Tricks bei den Arbeiten mit *P. pastoris*.

... allen Mitarbeitern der Abteilung Kinne, die mich stets freundschaftlich unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich hier Petra Glitz und Christiane Pfaff für die Durchführung der COS-7-Zellkultur und Daniel Scharlau für die Hilfe und die kritische Interpretation bei den TPST-Lokalisations-Experimenten danken.

... Prof. R.K.H. Kinne und Prof. E. Kinne-Saffran für die warme Anteilnahme am Fortgang meiner Arbeit und die persönliche Unterstützung.

... den Mitarbeitern der AG Bayer, die mir jeden Tag von früh bis spät zur Seite standen: Dr. Elena Bayer, Dr. Stefan Harjes, Elena Guiberman, Jonathan W. Müller (danke für das Lesen des Skriptes!), Matthias Rabiller, Karl-Heinz Müller, Bernhard Griewel und zeitweise auch Alexander Giffey. Den Sandsack werde ich wohl verdient haben.

... Beate Schölermann. Ohne Dich würde diese Arbeit ganz anders sein. Ich danke Dir für die vielen klugen Experimente, die perfekte Zusammenarbeit und die vielen Beiträge zu dieser Arbeit. Außerdem für die unschätzbare Freundschaft in wirklich allen Phasen, durch die ich in den letzten 2, 5 Jahren gegangen bin.

... Winfried Göttlich. Es war schwierig für mich, Dich immer 450 km entfernt zu wissen. Und doch haben mir unsere Telefonate und gemeinsamen Wochenenden häufig Kraft gegeben. Ich wünsche uns beiden eine klarere Zukunft.

Lebenslauf

Sandra Göttisch, geb. Hauk
Harkortstr. 106
44225 Dortmund

Schulbesuch:

01.09.81 – 06.07.90 OS "Frieden", Halle/Saale
04.09.90 – 25.06.93 Institut zur Vorbereitung auf ein Auslandsstudium, ab 01.09.1991 Gymnasium am Reileck, Halle/Saale

Studium:

01.09.93 – 30.11.93 Studium der russischen Sprache an der Staatlichen Kuban-Universität Krasnodar, Russland

18.01.94 – 18.07.94 Au-Pair – Aufenthalt in Grossbritannien, gleichzeitig Studium der englischen Sprache und unterrichten der deutschen Sprache für englische Schüler am Sutton Coldfield College, Birmingham, Grossbritannien

02.08.94 – 28.08.94 Auffrischkurs an der Staatlichen Kuban-Universität Krasnodar, Russland

01.10.94 – 28.07.99 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale (Thema der Diplomarbeit: „Versuche zur Klonierung eines PIN1 homologen Gens und Reinigung des Proteins aus *Xenopus laevis*“ in der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft)

Berufliche Tätigkeiten:

09 / 1999 – 09 / 2000 Forschungsaufenthalt in der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle/S. zum Thema: „Untersuchungen zur Zellzyklus-Regulation von PIN1“

seit 10 / 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, zum Thema: „Physiologische Charakterisierung und Expression von humanen Tyrosylprotein Sulfotransferasen“

Praktika:

21.08.95 – 30.09.95 & 26.08.96 – 04.10.96 Praktikum bei Hoechst Schering
AgrEvo GmbH, Abteilung Forschung Biochemie
19.07.97 – 30.09.97 Praktikum an der University of Michigan, Michigan, USA, als Research Scholar

Abschlüsse:

06 / 1993 Reifezeugnis (Note: 1, 0)
12 / 1994 Certificate in Advanced English
07 / 1996 englischer Fachkurs Biowissenschaften
04 / 1998 English for Business – Second level der London Chamber of Commerce and Industry Examination Board (“pass with distinction”, “pass”)
07 / 1999 Diplom – Biochemiker (“Sehr gut”)

Stipendium:

09 / 2000 Heräus-Stipendiat der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte (GDNÄ)