

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung funktioneller Aminosäuren der UDP-N-
Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosaminkinase

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Heinrich Wieland

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Reutter
2. Prof. Dr. D. Grimm
3. Prof. Dr. rer. Nat. S. Kelm

Datum der Promotion: 09.09.2011

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	III
1. EINLEITUNG	
1.1. Struktur von Sialinsäuren	1
1.2. Vorkommen von Sialinsäuren	3
1.3. Biosynthese von Sialinsäuren	4
1.4. Funktion der Sialinsäuren	5
1.5. Erbkrankheiten aufgrund defekter Sialinsäure-Synthese	9
1.6. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-kinase	10
2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	13
3. ERGEBNISSE	13
3.1. Auswahl der Mutanten des Tryptophan-204 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	14
3.2. Generierung der Punktmutanten durch gerichtete Mutagenese	14
3.3. Pilotexpression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in <i>S. cerevisiae</i>	18
3.4. Klonierung der Gene der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in pYES2.	21
3.5. Expression der Mutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase in <i>S. cerevisiae</i>	22
4. DISKUSSION	24
5. ZUSAMMENFASSUNG	28
6. MATERIALIEN UND METHODEN	29
6.1. Materialien	29
6.1.2. Bakterienstamm	29
6.1.3. Hefestamm	29
6.1.4. Medien und Kultivierung der Zellen	29
6.1.5. Primer	31
6.1.6. Chemikalien	32
6.1.7. Geräte	32
6.2. Methoden	33

6.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	33
6.2.2. Expression von rekombinantem Protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
6.2.3. Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	42
LITERATUR	43
ABBILDUNGEN UND TABELLEN	50
ANHANG	
1. LEBENS LAUF	51
2. DANKSAGUNG.....	52
3. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	53

ABKÜRZUNGEN

Ac Acetyl

bp Basenpaare

CMP-Neu5Ac Cytidinmonophosphat-*N*-Acetylneuraminsäure

Da Dalton

DMSO Dimethylsulfoxid

DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

FPLC Fast Protein Liquid Chromatography

GalNAc *N*-Acetylgalactosamin

GlcNAc *N*-Acetylglucosamin

IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Lt Lactoyl

ManNAc *N*-Acetylmannosamin

Me Methyl

NCAM Neural-Cell-Adhesion-Molecule

Neu5Ac *N*-Acetylneuraminsäure

OD Optische Dichte

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS Phosphate buffered saline

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

ppm parts per million

Prop Propyl

PSA Polysialic acid

Rf Retentionsfaktor

RT Raumtemperatur

SDS Sodiumdodecylsulfate

Sia Sialinsäure

Trp Tryptophan

Tris Trihydroxymethylaminomethan

U Unit

1. EINLEITUNG

1.1. Struktur von Sialinsäuren

Die Familie der Sialinsäuren umfaßt mehr als 50 natürlich vorkommende Mitglieder (Angata und Varki, 2002). Ihr gemeinsamer Vorläufer ist die Neuraminsäure, welche aus einem Grundgerüst von neun Kohlenstoffatomen besteht. Dieses Molekül wird am C9-Atom carboxyliert, was dem Molekül unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung verleiht, und am C5-Atom entweder N-acyliert oder -glycolyliert. Als O-Substituenten an den Hydroxylgruppen von C4, C7, C8 und C9 konnten Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl-, und Phosphorylgruppen nachgewiesen werden, wodurch sich die große Vielfalt unter den Sialinsäuren ergibt. Die unsubstituierte Form, die Neuraminsäure, kommt in der Natur nicht vor.

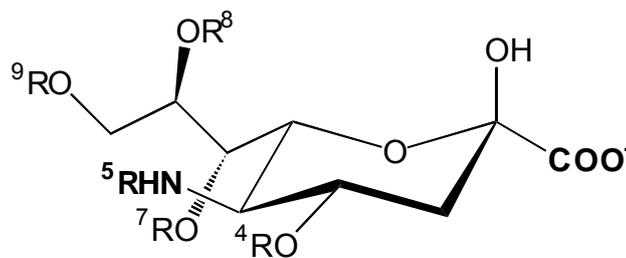


Abbildung 1: Das Grundgerüst der Sialinsäuren

Sialinsäuren sind N-acylierte (R2 = Acetyl- oder Glycolylgruppen) Derivate der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen als mögliche O-Substituenten (R1, R3, R4, R5). Bei Neu5Ac, der häufigsten Sialinsäure, liegen alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert vor.

Biosynthetischer Vorläufer aller Sialinsäuren und gleichzeitig ihr häufigster Vertreter ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Die Sialinsäuren werden terminal durch Sialyltransferasen auf das nicht reduzierende Ende von Oligosacchariden in α 2,3- bzw. α 2,6-Verknüpfung übertragen. Sie sind sowohl in N-Glycanen als auch in O-Glycanen und Glycolipiden zu finden und werden dann als Ganglioside bezeichnet (bestehend aus einem hydrophoben Anteil, dem Ceramid, und einem hydrophilen Anteil, der Oligosaccharid-Kette) welche Oligosialylierungen mit α 2,8-Verknüpfung aufweisen. Ganglioside sind Moleküle, welche im Gewebe sämtlicher Vertebraten vorkommen.

N-Glycane besitzen eine gemeinsame Core-Struktur aus zwei N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) und drei Mannoseresten. Über einen N-Acetylglucosaminrest wird diese Core-Struktur an Asparagin in der Konsensussequenz –Asn-Xxx-Ser/Thr von Glycoproteinen gebunden. Es lassen sich drei Arten des variablen Strukturteils unterscheiden: mannosereiche N-Glycane besitzen neben der Core-Struktur nur noch Mannosereste; die des komplexen Typs besitzen zusätzlich N-Acetyllactosamineinheiten, Fucosen und Sialinsäuren; der hybride Typ stellt eine Mischform des mannosereichen und des komplexen Typs dar. Die Strukturen der O-Glycane sind über einen N-Acetylgalactosaminrest an Serin oder Threonin von Glycoproteinen gebunden.

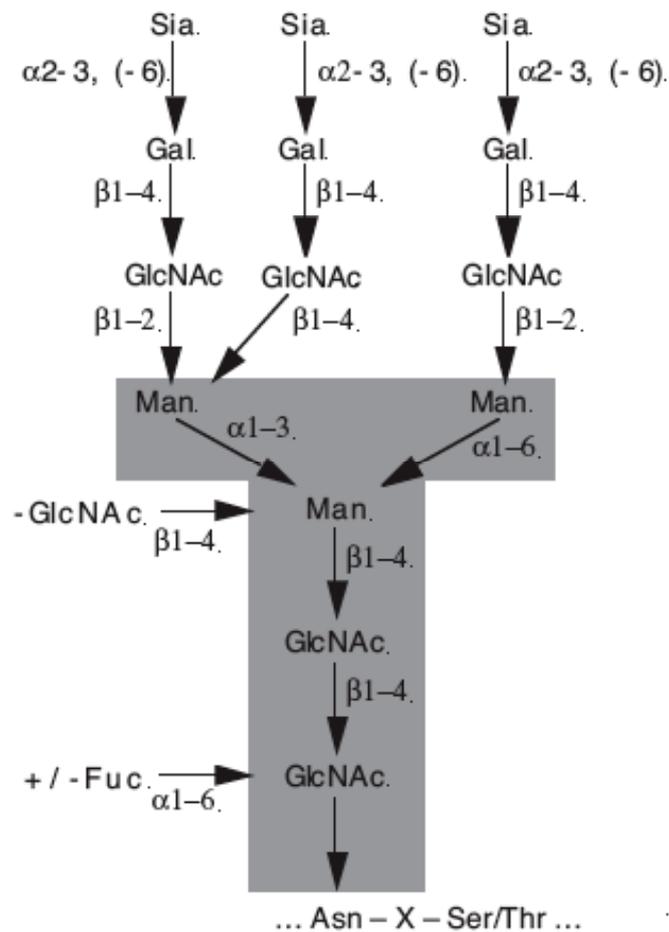


Abbildung 2: Grundstruktur eines triantennären, komplexen N-Glycans.

Die für alle N-Glycane gemeinsame Kernstruktur (GlcNAc₂Man₃) ist grau unterlegt. ...Asn-X-Ser/Thr... ist das Aminosäure-Sequenzmotiv für die N-Glycosylierung. Neben dem in dieser Abbildung gezeigten triantennären Glycan sind bei Kohlenhydratstrukturen des komplexen Typs zusätzlich mono- und biantennäre Formen möglich.

1.2. Vorkommen von Sialinsäuren

Sialinsäuren kommen in unterschiedlichen Variationen in allen höheren Organismen vor. Die größte Vielfalt an Sialinsäuren besitzen Deuterostomen. Bei ihnen kommen, im Gegensatz zu Vertebraten, welche in der Regel nur O-acetylierte und eventuell noch O-lactoylierte Varianten besitzen, alle Varianten der O-Modifikation vor (Angata und Varki, 2002). Unter den einzelnen Wirbeltierarten kann sich die Vielfalt der Sialinsäuren stark unterscheiden. Humanes Gewebe beispielsweise enthält nur drei verschiedene Typen von Sialinsäuren, während allein in der Speicheldrüse des Rindes 14 unterschiedliche Arten nachgewiesen wurden. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist das Fehlen von Neu5Gc beim Menschen. Bis zu unseren nächsten Verwandten, den Schimpansen, kommt diese Sialinsäure in allen Wirbeltieren vor. Beim Menschen bewirkt ein Defekt im CMP-Neu5Ac-Hydroxylase-Gen, der zur Expression eines inaktiven Proteins führt, das Fehlen von Neu5Ac im humanen Gewebe (Irie *et al.*, 1998). In fötalem Gewebe, sowie in Tumoren konnten jedoch geringe Mengen von Neu5Gc nachgewiesen werden (Varki, 2001).

Bei Insekten konnte die Expression von Sialinsäuren in bestimmten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Malykh *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1992). Unter bestimmten Bedingungen können Insektenzellen (Sf9-Zellen), welche zur rekombinanten Produktion von Proteinen benutzt werden, ebenfalls sialylierte Oligosaccharide synthetisieren (Watanabe *et al.*, 2002). Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob die Sialinsäuren von den Insekten selbst hergestellt werden, da eine Analyse des inzwischen komplett sequenzierten Genoms von *Drosophila melanogaster* ergab, daß es potentielle Gene für eine GlcNAc- bzw. eine N-Acetylmannosamin (ManNAc)-Kinase, eine Neu5Ac-9-Phosphat-Synthetase, eine CMP-Neu5Ac-Synthetase, einen CMP-Neu5Ac-Transporter und Sialyltransferasen gibt (Angata und Varki, 2002), jedoch fehlen Homologien für die Gene der GlcNAc-2-Epimerase bzw. der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Da diese beiden Enzyme in der Lage sind, ManNAc zu synthetisieren, scheinen Insekten für die Biosynthese von Sialinsäuren auf exogenes ManNAc oder Neu5Ac angewiesen zu sein. Möglich wäre, daß die Zucker über die Nahrung aufgenommen werden, oder daß sie von symbionten Bakterien im Darm der Insekten stammen (Angata und Varki, 2002). Eine weitere Möglichkeit, sich Sialinsäuren zunutze zu machen, ohne diese jedoch selbst vollständig synthetisieren zu können, ist bei Trypanosomen bekannt (*Trypanosoma brucei rhodensei* und *brucei gambiensi*, Erreger der Schlafkrankheit), besonders bei *Trypanosoma cruzi* (Erreger der Chagas-Krankheit). Diese übertragen die Sialinsäuren mit Hilfe von Transsialidasen von Zellen des Wirtsorganismus auf eigene Glykokonjugate (Übersicht bei Colli, 1993).

Die meisten Bakterien, die Sialinsäuren besitzen, sind pathogen für Menschen und Tiere, so zum Beispiel *E. coli* und *Neisseria meningitidis*. Dies führte zu der Hypothese, daß die Bakterien ihren Sialinsäurestoffwechsel durch horizontalen Gentransfer von den jeweiligen Wirtsorganismen erworben haben (Varki, 1992). Andererseits exprimieren auch einige nicht-pathogene Bakterien, wie beispielsweise einige *Rhodobacter*-Spezies, Sialinsäuren (Krauss *et al.*, 1992), was zusammen mit der schwachen Sequenzhomologie der funktionell verwandten Gene der Sialinsäurebiosynthese von Bakterien und Vertebraten eher für die Entstehung des Zuckers während eines frühen Stadiums der Evolution in einem gemeinsamen Vorläuferorganismus spricht (Angata und Varki, 2002).

1.3. Biosynthese von Sialinsäuren

Die Biosynthese der Sialinsäuren endet mit der Synthese des aktivierten Nucleotidzuckers CMP-Neu5Ac, zuvor fünf enzymatische Schritte: Zunächst wird UDP-GlcNAc von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in zwei enzymatischen Reaktionen in ManNAc-6-Phosphat umgewandelt. Dabei entsteht zunächst, über das Intermediat [N-Acetyl]-2-Amidoglucal, ManNAc (UDP-GlcNAc-2-Epimerase). Die benötigte Reaktionsenergie entsteht durch das Abspalten des UDP. ManNAc wird nun phosphoryliert, wobei ATP als Phosphatdonator dient (ManNAc-Kinase) und ManNAc-6-Phosphat entsteht. Dieses wird im nächsten Schritt durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase zu ManNAc-9-Phosphat. Für diese Neu5Ac-9-Reaktion wird Phosphoenolpyruvat benötigt. Als nächstes wird das Phosphat von der Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase abgespalten, und es entsteht Neu5Ac, welches durch die CMP-Neu5Ac-synthetase, unter CTP-Verbrauch, in den aktivierten Nucleotidzucker CMP-Neu5Ac umgewandelt wird.

Die ersten vier Schritte werden im Cytosol katalysiert. Der letzte Schritt, die Bildung des CMP-Neu5Ac, erfolgt im Gegensatz zu allen anderen Nucleotidzuckern, im Kern. Die biologische Bedeutung dieses überraschenden Vorganges ist noch unbekannt. Die Nucleotidzucker CMP-Neu5Ac, erfolgt im Kern. Die Nucleotidzucker CMP-Neu5Ac und CMP-Neu5Gc werden mittels eines spezifischen Transporters aus dem Cytosol durch einen Antiport mit CMP in die Golgi-Vesikel transportiert (Abeijon *et al.*, 1997). Der entsprechende eukaryontische Nucleotidzuckertransporter ist kloniert und molekular charakterisiert worden (Eckhardt *et al.*, 1996). Neu5Ac wird im trans-Golgi bzw. im trans-Golgi-Reticulum durch verschiedene Sialyltransferasen, welche CMP-Neu5Ac oder CMP-Neu5Gc als Substrat benötigen, auf die N- und O- Glycane von Glycoproteinen und auf Glycosphingolipide übertragen (Kornfeld und

Kornfeld, 1985). Über die Zell- und Substratspezifität dieser etwa 25 Sialyltransferasen ist erst wenig bekannt. Erst nach diesem Schritt werden die verschiedenen Modifikationen an den Hydroxylgruppen der Neu5Ac durch Acetyl-, Lactoyl-, Methyl- und Sulfonyltransferasen eingeführt, was zu der großen Vielfalt der Sialinsäuren führt. Einzige Ausnahme ist die Neu5Gc, deren N-Acetylrest bereits auf der Ebene von CMP-Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-hydroxylase hydroxyliert wird (Shaw und Schauer, 1988). Für den Abbau und die Wiederverwertung von Sialinsäuren aus Glycokonjugaten sind intrazelluläre, meist lysosomale hydrolytische Enzyme notwendig.

Neuerdings ist es gelungen, die N-Acetylseitenkette der Sialinsäure mit einem einfachen Vorgehen biochemisch zu modifizieren. Statt des physiologischen Vorläufers der Neu5Ac, N-Acetylmannosamin, wurde ein um eine Methylengruppe verlängerter Vorläufer, das N-Propanoylmannosamin, *in vitro* bzw. *in vivo* zur entsprechenden N-Propanoylneuraminsäure metabolisiert und in Glycokonjugate eingebaut (Kayser *et al.*, 1992). Auch N-Acyl-homologe Mannosaminderivate wurden metabolisiert, wodurch die Anzahl der biologisch aktiven Sialinsäuren deutlich erhöht wurde (Keppler *et al.*, 2001). Dieses Verfahren wurde in modifizierter Form von mehreren Gruppen in unterschiedlichen Ländern übernommen. Am erfolgreichsten von den Gruppen um Bertozzi und Yorema, welche reaktive Oligosaccharide auf Zelloberflächen exprimieren konnten. Diese konnten unter physiologischen Bedingungen kovalente Bindungen mit Molekülen, welche eine komplementäre reaktive Gruppe tragen, eingehen (Mahal *et al.*, 1997)

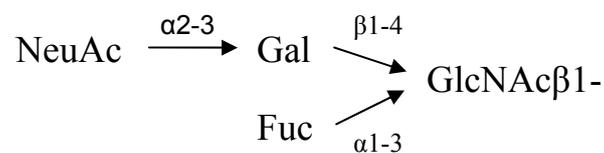
1.4. Funktion der Sialinsäuren

Aufgrund ihrer Variabilität tragen Sialinsäuren entscheidend zur Strukturvielfalt von Glycokonjugaten bei. Deshalb lassen sich zahlreiche biologischen Funktionen direkt mit Sialinsäuren in Verbindung bringen. Sie eignen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften und ihres sauren Charakters besonders für einige spezifische Funktionen. Beispielsweise können sie biologisch aktive Strukturen mit terminalen Galaktosen maskieren und somit deren Erkennung durch Asialglycoproteinrezeptoren der Leber verhindern (Ashwell *et al.*, 1989, Kelm und Schauer, 1997). Außerdem sorgt ihre negative Ladung für das Abstoßen von Zellen untereinander oder von der extrazellulären Matrix. Zahlreiche Tumoren überexprimieren Sialinsäuren auf ihren Oberflächen, was zum Entzug vor der Erkennung durch das Immunsystem

führt und mit einer erhöhten Malignität in Verbindung gebracht wird (Bhavanadan, 1991; Hakomori, 1989). Zu diesem Zweck nutzen Zellen des Wilms-Tumor sogar Polysialinsäuren (Roth *et al.*, 1988).

Aber auch bei physiologischen Prozessen spielen Polysialinsäuren eine wichtige Rolle, so zum Beispiel bei der Vermittlung der Abstoßung neuronaler Zellen im Embryonalstadium (Hoffman und Edelman, 1983). Die variable Polysialierung neuronaler Zellen reguliert die Plastizität des neuronalen Systems während der Entwicklung und hilft außerdem bei Lernvorgängen und der Ausbildung des Gedächtnisses (Bruses und Rutishauser, 2001).

Aufgrund ihrer Lage auf den Oberflächen von Zellen sind Sialinsäuren an unterschiedlichen Adhäsionsvorgängen beteiligt. Wichtig für die Vermittlung dieser Vorgänge sind spezifisch bindende Lektine. So wird zum Beispiel das Rolling, welches das Einwandern der Leukozyten in aktiviertes Gefäßendothel initiiert, durch die Interaktion von Selektinen mit der Oberfläche der Leukozyten gesteuert. Hierbei dient das Sialyl-Lewis^x-Antigen, welches peripher Neu5Ac besitzt, als Rezeptor für E-Selektin.



Sialyl-Le^x-Antigen

Die größte Familie Sialinsäure-bindender Lektine in Säugetieren bilden die Siglecs. Beim Menschen sind 13 verschiedene Siglecs gefunden worden. Die meisten befinden sich auf den Zellen des Immunsystems. Näher untersucht wurde zum Beispiel Siglec1/Sialoadhäsine, welches ausschließlich von Makrophagen exprimiert wird und die Interaktion dieser Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems über die Bindung $\alpha 2,3$ -gebundener Sialinsäuren reguliert (Hartner *et al.*, 2001). Siglec2/CD22 ist an der homophilen Interaktionen von B-Zellen beteiligt und bindet ausschließlich $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren (Tedder *et al.*, 1997).

Andererseits nutzen auch Pathogene Sialinsäuren als Bindungspartner auf ihren Zielzellen. So sind virale Hämagglutinine sialinsäurebindende Lektine, welche die Agglutination von Erythrozyten vermitteln können. Das Hämagglutinin des Influenza A-Virus ist das derzeit am besten untersuchte. Seine Spezifität für bestimmte Sialinsäuretypen ist streng abhängig von der

Sialylierung der Wirtszelle, z.B. von Mensch, Huhn oder Schwein (Suzuki *et al.*, 2000). So kann es durch Kreuzinfektionen von Influenza A-Viren, insbesondere bei Haustieren untereinander und mit Menschen, verstärkt durch horizontalen Gentransfer unter den Virusspezies vorkommen, so daß sich tierische Viren an humane Zellen anpassen und so zu saisonalen Epidemien führen (Ito *et al.*, 1998). Influenzaviren besitzen noch ein zweites Sialinsäure-bindendes Protein, eine Neuraminidase, welche nach der Reifung den über das Hämagglutin an die Wirtszelle gebundenen Virus von der Plasmamembran abtrennt und so die Infektion neuer Zellen erlaubt (Taylor, 1996). Spezifische Inhibitoren der Neuraminidase konnten zu marktfähigen Medikamenten wie Relenza und Zanamvir weiterentwickelt werden (v. Itzstein *et al.* 1993, Cheer und Wagstaff, 2002).

Mittels „Biochemical Engineering“ der N-Acyl-Seitenkette der NANA konnte die entscheidende Rolle der sialylierten Rezeptoren der Wirtszellen für Wechselwirkungen mit verschiedenen Viren gezeigt werden. Synthetisch N-Acyl-modifizierte D-Mannosamine können von Zellen aufgenommen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu entsprechenden N-Acyl-modifizierten Neuraminsäuren metabolisiert werden. Solche erfolgreich in Zellen eingebrachte D-Mannosamine sind beispielsweise N-Propanoyl- (ManNProp), N-Butanoyl- (ManNBut), N-Pentanoyl- (ManNPent) D-Mannosamin. Alle diese Verbindungen werden im Sialinsäure-Biosynthesepfad metabolisiert und in Sialoglycokonjugaten der Zelloberfläche eingebaut, wobei sie je nach Zell-Typ 10-85% der normalen Sialinsäuren ersetzen. Die Verwendung dieser Verbindungen in verschiedenen biologischen Systemen hat wichtige und unerwartete Funktionen der N-Acyl Seitenkette von Sialinsäuren offenbart, so zum Beispiel die ausschlaggebende Rolle für die Wechselwirkung von Polyoma- oder Influenza A-Viren mit den sialylierten Rezeptoren der Wirtszelle (Keppler *et al.*, 2000).

Adhäsine, die Sialinsäure-bindenden Lektine pathogener Bakterien, vermitteln ebenfalls die Bindung des Mikroorganismus an die Wirtszelle (Ofek und Sharon, 1990). Da die Expression der Adhäsine oft stammspezifisch erfolgt, werden meist auch definierte Gewebe infiziert. In einigen Fällen können auch Toxine von Mikroorganismen Sialinsäuren binden. Cholera toxin bindet zum Beispiel mit seinen fünf B-Untereinheiten Ganglioside der Plasmamembran vom Typ GM1 und kann nach dieser Fixierung die toxisch wirkende A-Untereinheit in das Cytosol der Zelle transferieren (Richards *et al.*, 1979). Botulinustoxin und Diphtherietoxin nutzen ebenfalls die Bindung an Ganglioside innerhalb ihres Infektionsmechanismus (Schengrund *et al.*, 1991).

Für die biologische Funktion einiger Glycoproteine ist die Präsenz von Sialinsäuren unabdingbar. So führt zum Beispiel die Desialylierung des Somatostatinrezeptors zu einer wesentlich schlechteren Ligandenbindung (Rens-Domiano und Reisine, 1991). Ebenso ist die

Asialoform des Nukleoporins p62, welches den aktiven Proteintransport vom Cytosol in den Zellkern unterstützt, in seiner Aktivität stark reduziert (Emig *et al.*, 1995). Für Erythropoetin wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Wasley *et al.*, 1991); dies ist allerdings auf die stark verminderte Halbwertszeit des Asialoproteins im Blut zurückzuführen (Egrie und Brown, 2001). Die Zirkulationszeit von Blutzellen wird ebenfalls durch ihren Gehalt an terminalen Sialinsäuren reguliert: Mit der Zeit verlieren Erythrozyten und Thrombozyten Sialinsäuren oder Sialoglycoproteine und werden dann von Zellen des reticuloendothelialen Systems erkannt und abgebaut (Kluge *et al.*, 1992; Schlepper-Schäfer *et al.*, 1980). Des Weiteren erkennen in der Leber lokalisierte Asialoglycoproteinrezeptoren Serumglycoproteine und Antigen-Antikörperkomplexe nach Verlust ihrer Sialinsäuren, so daß sie endocytiert und in den Lysosomen abgebaut werden können (Ashwell und Harford, 1982). Ob die Zellen beziehungsweise Glycoproteine ihre Sialinsäuren durch nicht-enzymatische Hydrolyse oder durch Sialidasen verlieren, wurde bis heute nicht geklärt.

Autoantikörper gegen Ganglioside konnten bei einigen autoimmunen Funktionsstörungen nachgewiesen werden, beispielsweise beim Guillain-Barré-Syndrom, bei multipler Sklerose, Lupus erythematodes, Hashimoto Thyreoiditis und auch beim Diabetes mellitus Typ I. Hier konnten Autoantikörper und T- Lymphozyten gegen verschiedene Insel-Antigene lange vor dem Auftreten klinischer Anzeichen im Blutkreislauf nachgewiesen werden. Während dieser Prodromalphase werden wahrscheinlich die pankreatischen β -Inselzellen zerstört. Unter den Ziel-Autoantigenen sind einige Proteine, andere aber saure Glycolipide wie die Ganglioside GT3, GD4 und vor allem GM2-1. Es wird spezifisch in den Inselzellen des Pankreas exprimiert. Es wurde nachgewiesen, daß GM2-1 ein Ziel für IgG-Antikörper darstellt, welche mit dem Entstehen von Diabetes mellitus bei Verwandten ersten Grades von Typ I-Diabetikern in Verbindung gebracht werden (Miasi *et al.*, 1997). Das Guillain-Barré-Syndrom wird häufig mit einer *Campylobacter jejuni*-Infektion in Verbindung gebracht. Dieses Bakterium besitzt eine Lipopolysaccharid-Struktur, welche den Zucker-Epitopen von Sialinsäure-haltigen Glycolipiden und Gangliosiden ähnlich sind und dadurch das primäre Antigen für Anti-Gangliosid-Antikörper darstellen können (Fredmann 1998).

1.5. Erbkrankheiten aufgrund defekter Sialinsäure-Synthese

Einige Erbkrankheiten zeigen, wie vielfältig Sialinsäuren in unserem Organismus vorkommen und wie wichtig sie für die Entwicklung und für das physiologische Funktionieren unseres Organismus sind.

Sialurie ist eine seltene autosomal dominant erbliche Stoffwechselkrankheit, welche eine Anhäufung von freien Sialinsäuren im Cytoplasma und deren vermehrte Ausscheidung im Urin (mehrere Gramm freier Neu5Ac pro Tag) zur Folge hat. Die bisher untersuchten Patienten weisen eine Punktmutation von Arginin-263 beziehungsweise Arginin-266 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf (Sepalla *et al.*, 1999). Die Mutationen treten heterozygot auf, der Gendefekt wird also dominant vererbt (Leroy *et al.*, 2001). Der Überproduktion von Neu5Ac liegt ein Verlust des Feedback-Mechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch das Endprodukt CMP-Neu5Ac zugrunde (Seppala *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1989, Kornfeld *et al.*, 1964). Die Krankheit manifestiert sich innerhalb weniger Monate nach der Geburt mit Hepatomegalie und psychomotorischer Retardierung (Ferreira *et al.*, 1999; Enns *et al.*, 2001).

Die erbliche Einschlusskörper-Myopathie (hereditary inclusion body myopathy, HIBM) ist eine einzigartige Gruppe von neuromuskulären Störungen, mit Manifestation im Erwachsenenalter, langsam fortschreitende distale und proximale Schwäche und einer typischen Muskel-Pathologie mit geriffelten Vakuolen und filamentösen Einschlüssen. Die Myopathie betrifft hauptsächlich die Beinmuskulatur, wobei die Verteilung ungewöhnlich ist, da der M. quadriceps femoris nicht betroffen ist. Dieses spezielle Verteilungsmuster, welches Quadrizeps-aussparende Myopathie (quadriceps-sparing myopathy, QSM) genannt wird, wurde sowohl bei Juden, welche aus dem Mittleren Osten stammten, wie auch bei Nicht-Juden aus dieser Region entdeckt. Das Gen, welches für die HIBM bei Juden aus dem Mittleren Osten verantwortlich ist, wurde auf dem Chromosom 9p12-13 lokalisiert. Genomische Untersuchungen bei 104 Betroffenen aus 47 Familien deuten auf ein einziges Gründerchromosom für diese Gruppe. Dagegen zeigen einzelne nicht-jüdische Familien aus Indien, den USA, Japan und den Bahamas mit Fällen von QSM, welche ebenfalls im Zusammenhang mit der gleichen 9p12-13 Region drei verschiedene Haplotypen (Literatur). Nachdem andere potentielle Gene ausgeschlossen worden waren, wurden die Mutationen in dem Gen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von HIBM-Patienten entdeckt.

1.6. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-kinase

Die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese, nämlich die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu ManNAc-6-Phosphat unter Freisetzung von UDP über ManNAc, werden von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase katalysiert. Da gezeigt wurde, daß es sich hierbei um ein bifunktionelles Enzym handelt (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997; Effertz *et al.*, 1997) bezieht sich der ältere Teil der vorhandenen Literatur auf getrennte Enzyme beziehungsweise Enzymaktivitäten. Entdeckt wurde die UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase von Cardini und Leloir (1957). Sie beschrieben jedoch, daß sie UDP-GlcNAc in GalNAc spaltet. Kurz darauf wurde aber von Comb und Roseman (1958) richtiggestellt, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt um ManNAc handelt. Erst 1997 gelang es, eine stabile und homogene Fraktion aus Rattenleber zu gewinnen (Hinderlich *et al.*, 1997).

Die Enzyme der Sialinsäure-Biosynthese konnten in allen bisher untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wobei jedoch ihr Expressionsniveau stark variiert (van Rinsum *et al.*, 1983; van Rinsum *et al.*, 1984; Corfield *et al.*, 1985). Gewebe mit einer hohen Produktionsrate von Serumglycoproteinen und Mucinen, wie zum Beispiel Leber, Darmmucosa oder Speicheldrüse, zeigen hohe Expressionsraten einiger Enzyme, vor allem aber des Schlüsselenzyms, der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Hepatombgewebe, welches nicht zur Sekretion von Proteinen fähig ist, zeigt im Gegensatz dazu eine stark verminderte Expression von Enzymen der Sialinsäurebiosynthese (Harms *et al.*, 1973). Dies deutet darauf hin, daß Serumglycoproteine einen Großteil der neu synthetisierten Proteine für sich beanspruchen.

Bisher wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Ratte (Stäsche *et al.*, 1997), Maus (Horstkorte *et al.*, 1999) und Mensch (Lucka *et al.*, 1999) kloniert. Es zeigte sich, daß die Homologie der Aminosäuresequenz sehr hoch ist: von 722 Aminosäuren sind zwischen Ratte und Maus vier, zwischen Ratte und Mensch zehn und zwischen Maus und Mensch zwölf unterschiedlich. Punktmutationen konservierter Aminosäuren führen zu einem selektiven Verlust der Enzymaktivität der jeweils betroffenen Domäne, ohne die Aktivität der anderen zu beeinflussen (Effertz *et al.*, 1999). Sequenzvergleiche mit Zuckerkinasen beziehungsweise bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen legen zwei funktionelle Domänen nahe, eine N-terminale Epimerase- und eine C-terminale Kinase-Domäne. Die Domänen lassen sich auch getrennt funktionell exprimieren (Blume *et al.*, 2004), was auf zwei relativ autarke Domänen schließen lässt. Eine Funktion welche der Zusammenschluß von UDP-GlcNAc-2-Epimerase und ManNAc-Kinase zu einem bifunktionellen Enzym haben könnte, ist daß bei niedrigen ManNAc-

Konzentrationen des ManNAc vom Epimerase-Zentrum zum Kinase-Zentrum „herübergereicht“ werden kann.

Das gereinigte Enzym aus Rattenleber kommt in Anwesenheit von UDP-N-Acetylglucosamin bevorzugt als Tetramer vor (Ghaderi *et al.*, 2007). Kornfeld *et al.* (1964) konnten zeigen, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch CMP-Neu5Ac Feedback-inhibiert wird. Hinzu kommt, daß das Enzym durch die Proteinkinase C phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Horstkorte *et al.*, 2000). Diese komplexen Regulationsmechanismen zeigen, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase ein Schlüsselenzym der Neu5Ac-Biosynthese ist. Solche Regulationsmechanismen werden bei der ManNAc-Kinase nicht beobachtet.

Durch Arbeiten an hämatopoetischen Zelllinien, welche keine Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mehr aufwiesen, konnte die zentrale Rolle des Enzyms für die Regulation der Sialierung von Glycoproteinen und Glycolipiden der Plasmamembran gezeigt werden (Keppler *et al.*, 1999). Solche Zellen sind nicht mehr in der Lage, eigenständig Sialinsäuren zu bilden und weisen zahlreiche funktionelle Defekte auf, wie etwa das Fehlen der homophilen Interaktion von CD22 oder von P-Selektin mit seinen Liganden (Keppler *et al.*, 1999). Wird die UDP-2-GlcNAc-Epimerase/ManNAc-Kinase durch gezielte Mutagenese in der Maus ausgeschaltet, sterben die Embryonen spätestens am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse beweisen die essentielle Rolle der Sialinsäuren für die Embryonalentwicklung,

Der Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist relativ gut untersucht. Sie benötigt im Gegensatz zu anderen Epimerasen (z. B. die UDP-GlcNAc-4-Epimerase) kein Coenzym, wie etwa NADH, für die katalytische Reaktion, welche höchstwahrscheinlich in drei Schritten erfolgt (Tanner 2002). Im ersten Schritt wird das nicht-azide Wasserstoffatom am C2 durch eine Base abstrahiert, dann erfolgt die Elimination von UDP und schließlich die stereospezifische Re-Addition des Wasserstoffatoms an C2 und die Addition von OH an C1. Acetamidoglucal wurde schon früh als wichtiges Zwischenprodukt postuliert (Sommer und Ellis, 1972), und die Entdeckung des Metaboliten im Urin von Sialurie-Patienten belegte den beschriebenen Mechanismus (Kamerling *et al.*, 1979).

Der zweite Schritt der Neu5Ac-Biosynthese, die Phosphorylierung von ManNAc am C6-Atom, wird von der ManNAc-Kinase katalysiert. Entdeckt wurde sie von Gosh und Roseman (1961), eine erste Charakterisierung und partielle Anreicherung des Enzyms, welches sich instabil verhielt, erfolgte durch Kundig *et al.* (1966). Eine stabile homogene Fraktion aus Rattenleber zu gewinnen, gelang erst Hinderlich *et al.* (1997). Wie bei einem bifunktionellen Enzym zu erwarten, sind subzelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung identisch mit der UDP-GlcNAc-

2-Epimerase (van Rinsum *et al.*, 1983). Des weiteren wurde in Hepatomen eine stark verringerte Aktivität, bei erhaltener Kinaseaktivität, nachgewiesen (Harms *et al.*, 1973), ebenfalls ein früher Hinweis darauf, daß es sich bei der UDP-GlcNAc-2Epimerase/ManNAc-Kinase nicht um zwei einzelne sondern um ein bifunktionelles Enzym handelt.

Die ManNAc-Kinase ist spezifisch für ManNAc als Substrat, sie kann aber auch ManNAc-Derivate phosphorylieren, die an ihrer N-Acetylseitenkette modifiziert sind. So können sowohl ManNGc (Kundig *et al.*, 1966) als auch ManNAc-Derivate mit verlängerten N-Acylresten (Kayser *et al.*, 1992) in die Neu5Ac-Biosynthese eingeschleust werden.

2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. Daher ist es für viele Untersuchungen wichtig, die Struktur des Enzyms und insbesondere seines aktiven Zentrums zu kennen. Da von dem Enzym bis heute keine Kristallstruktur vorliegt, wird in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. Zur Umsetzung des Substrats UDP-GlcNAc in der Epimerase scheint es plausibel, daß der bei allen Wirbeltieren konservierte Tryptophanrest W204 (Abb. 3) mit seiner hydrophoben Seitenkette durch Interaktion mit dem Pyranosering des Zuckers oder mit dem Riboseteil des Nucleotids UDP im aktiven Zentrum des Enzyms für den Angriff einer Base optimal ausgerichtet. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Rolle dieses Tryptophanrestes bei der Enzymkatalyse durch Vergleich der Aktivität von Mutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne zu analysieren. Zu diesem Zweck sollte die cDNA für die Mutanten W204A, W204I, W204F und W204H hergestellt werden, die mutierten Proteine exprimiert und deren enzymatische Aktivität bestimmt werden. Zur Expression des Wildtyps und der Mutanten wird die Hefe *S. cerevisiae* benutzt, da dieser Organismus in der Lage ist, Proteine von der Größe der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu exprimieren und eine nur geringe endogene Aktivität aufweist.

1. Mensch	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKSKDY
2. Schimpanse	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKSKDY
3. Pongo	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKSKDY
4. Ratte	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKCKDY
5. Maus	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKCKDY
6. Hamster	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKCKDY
7. Huhn	DYMSIIRM <u>W</u> LGSKEMVRVMRK
8. Fugu	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DVKKEHDY
9. Zebrafisch	DYMSIIRM <u>W</u> LG__DDVKEQDY

Abbildung 3: Das konservierte Tryptophan-204 innerhalb der Proteinsequenz der Epimerase bei verschiedenen Wirbeltieren.

3. ERGEBNISSE

3.1. Auswahl der Mutanten des Tryptophan-204 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Eine Rolle des Tryptophan-Restes 204 bei der Enzymkatalyse der UDP-N-GlcNAc-2-Epimerase erscheint bei einem Vergleich mit UDP-Glucose-Glycosyltransferasen aus Bakterien möglich. So wurde gezeigt, daß ein konservierter Tryptophanrest in die Bindung von UDP-Glucose durch die Glycosyltransferase des Cytotoxins aus Clostridien involviert ist (Busch *et al.*, 2000). In Analogie dazu könnte W204 der Epimerase den UDP-GlcNAc-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms binden und korrekt orientieren. Hierbei könnte der Tryptophan-Ring direkt mit dem inneren hydrophoben Anteil des GlcNAc-Pyranose-Ringes interagieren und ihn so für die Epimerase-Reaktion im aktiven Zentrum ausrichten. Träfe dies zu, so sollte der Austausch des W204-Restes mit kleineren Seitengruppen (z. B. Alanin), oder raumgreifenden hydrophoben Seitengruppen (z.B. Ile), die eine spezifische Bindung mit dem GlcNAc-Ring nicht erlauben, zur Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Enzyms führen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß lediglich die aromatischen Eigenschaften des Indolrings des Tryptophans für die Bindung wichtig sind. Somit sollte der Austausch gegen eine andere aromatische Gruppe, etwa des Phenylalanins oder des Histidins, zu einer geringeren oder keiner Aktivitätsminderung führen (Strukturformeln der Aminosäuren siehe Abb. 4) Zur Analyse des Beitrags des Tryptophan-Restes 204 zum Reaktionsmechanismus des Enzyms sollte daher die Aktivität von Punktmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase, in denen W204 gegen die Aminosäurereste von Alanin, Phenylalanin, Isoleucin und Histidin ausgetauscht wurde mit dem Wildtyp verglichen werden. Dazu sollen die Punktmutationen (Abb. 5) durch gerichtete Mutagenese in die cDNA des Gens der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase eingeführt werden (Abb. 6).

3.2. Generierung der Punktmutanten durch gerichtete Mutagenese

Zur Einführung der Punktmutationen wurde die Methode der Site-Directed-Mutagenesis verwendet (Abb. 6). Bei dieser Methode werden degenerierte Primer in einer PCR eingesetzt, die die Mutation mittig tragen. Die für die Herstellung der einzelnen Mutanten spezifischen als Primer verwendeten Oligonucleotide sind im Methodenteil aufgelistet. Die PCR amplifiziert den kompletten Vektor. Parentale cDNA wird anschließend durch DpnI-Verdau entfernt. Mit den PCR-Produkten werden superkompetente *E.coli*-Zellen transformiert und auf Selektionsmedium

gezüchtet. Einzelne Kolonien werden expandiert, deren Plasmide gereinigt und der Sequenzanalyse unterworfen. „Richtige“ Plasmide werden dann vermehrt um größere Mengen an DNA für weitere Versuche zur Verfügung zu haben.

	197					204					211				
Wildtyp	Tyr	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	Trp	Leu	Gly	Asp	Asp	Val	Lys	Cys
W204A	Tyr	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	<u>Ala</u>	Leu	Gly	Asp	Asp	Val	Lys	Cys
W204I	Tyr	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	<u>Ile</u>	Leu	Gly	Asp	Asp	Val	Lys	Cys
W204F	Tyr	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	<u>Phe</u>	Leu	Gly	Asp	Asp	Val	Lys	Cys
W204H	Tyr	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	<u>His</u>	Leu	Gly	Asp	Asp	Val	Lys	Cys

Abbildung 4: Position der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp

Ausschnitt der Aminosäuresequenz der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sowie der zu untersuchenden Mutanten. Dargestellt sind die Aminosäuren 197 bis 211, die Mutation ist jeweils unterstrichen.

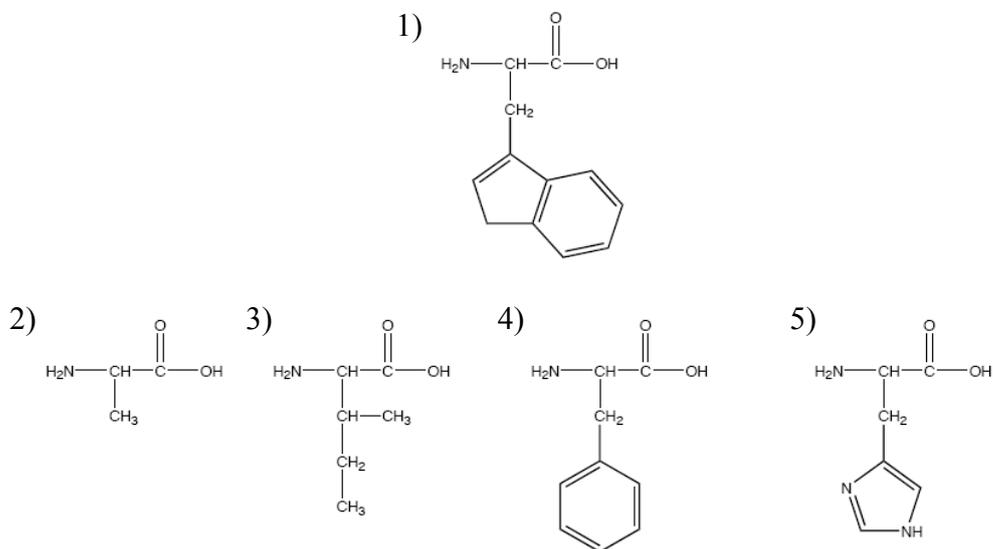


Abbildung 5: Darstellung der Aminosäuren Tryptophan, Alanin, Isoleucin, Phenylalanin und Histidin in Strukturformeln.

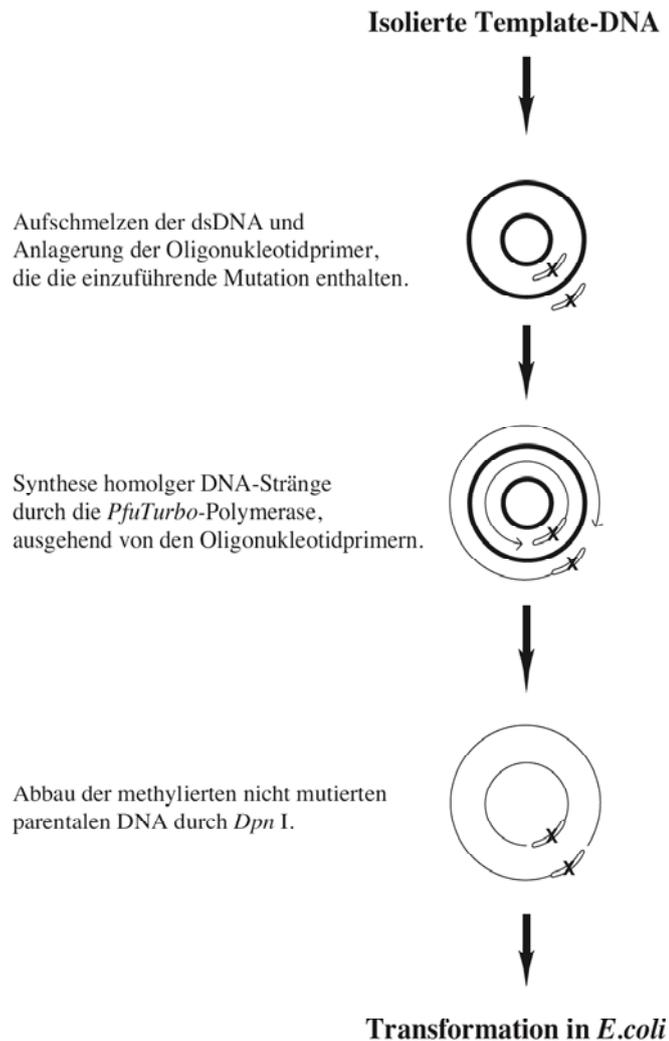


Abbildung 6: Prinzip der QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis.

Doppelsträngige Plasmid-DNA wird bei 95 °C denaturiert, so daß sich nach dem Auftrennen der Doppelstrang-DNA Oligonukleotidprimer, mit der einzuführenden Mutation, anlagern können. Ausgehend von diesen Primern werden von der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase komplementäre Stränge synthetisiert. Anschließend wird die parentale, methylierte und nicht mutierte DNA selektiv durch die Endonuklease *Dpn* I abgebaut. Die circulaire, doppelsträngige DNA mit der eingeführten Mutation wird in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Die cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase lag bereits kloniert im Vektor pFastBac vor (Abb. 7). Mit ihm wurden verschiedene Site-Directed-Mutagenesis-PCR's für die Herstellung der Punktmutanten W204A, W204F, W204H und W204I durchgeführt. Abb. 8 zeigt die erhaltenen PCR-Produkte für W204A, W204F und W204I. Trotz vielfacher Versuche war es leider nicht möglich, die cDNA für die Mutante W204H zu gewinnen. Daher musste auf die Herstellung dieser Mutante verzichtet werden. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in E.coli transformiert und die amplifizierten Plasmide isoliert. Anschließend wurde das Gen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in allen Fällen komplett sequenziert, um die entstandenen Mutationen nachzuweisen und eventuelle ungewollte Mutationen auszuschließen.

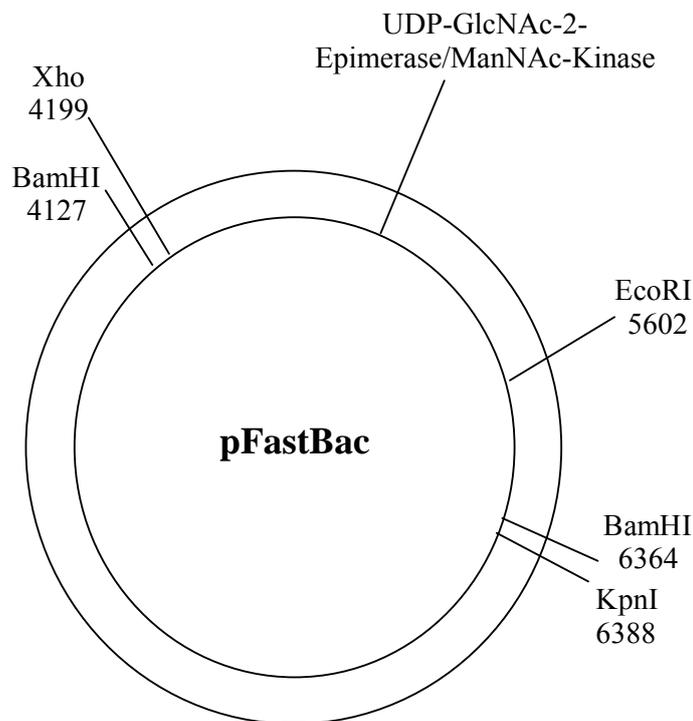


Abbildung 7: Der Vektor pFastBac

Dargestellt ist der Vektor mit dem Gen der UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc-Kinase als Insert zwischen den Schnittstellen für BamHI.

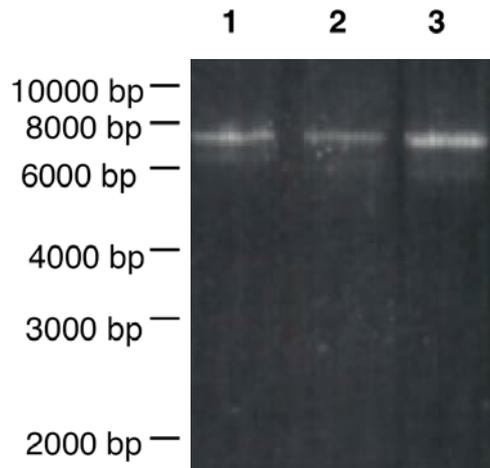


Abbildung 8: Auftrennung der Vektoren pFastBac/UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nach Site-Directed-Mutagenesis durch Agarosegelelektrophorese.

Die Mutanten W204F (1), W204A (2) und W204I (3) der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Die cDNA war in den Vektor pFastBac kloniert.

3.3. Pilotexpression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *S. cerevisiae*

Bei pFastBac handelt es sich um einen Vektor für die Proteinexpression in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirussystems. Dieses System ist technisch sehr aufwendig und wird in erster Linie für die Expression großer Proteinmengen genutzt. Da für die angestrebte Charakterisierung der Mutanten nur geringe Enzymmengen benötigt werden, wurde wegen der leichteren Zugänglichkeit und Kostengünstigkeit in dieser Arbeit das Expressionssystem der Hefe *S. cerevisiae* benutzt. Um die Funktionalität des Systems zu überprüfen, wurde zunächst eine Pilotexpression des Wildtyp-Enzyms durchgeführt. Dafür wurde die cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über das Restriktionsenzym *BamH* I in den high-copy-*E. coli*/Hefe-Shuttlevektor pYES2 (Abb. 9) umkloniert. Um sicherzustellen, daß beim Klonieren keine Fehler aufgetreten sind und sich die kodierende Sequenz der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im richtigen Leserahmen befindet, wurde das Konstrukt sequenziert.

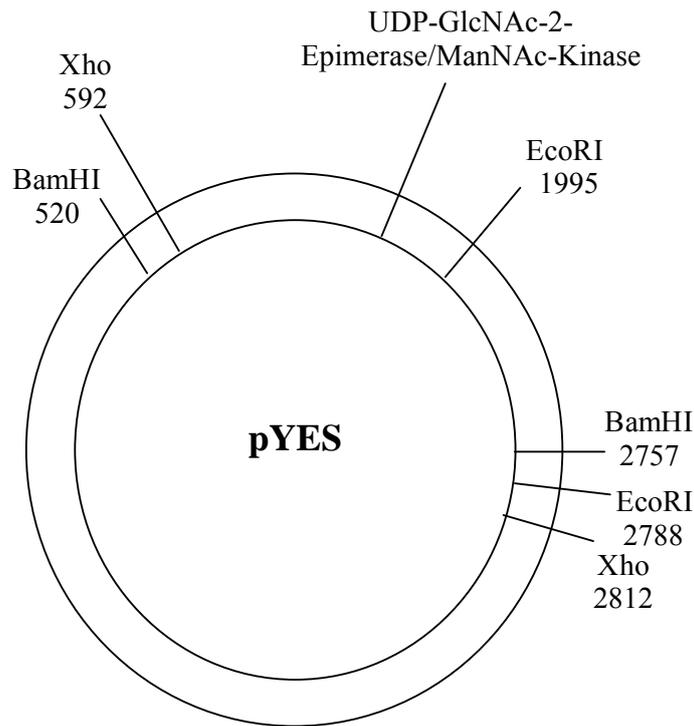


Abbildung 9: Der Vektor pYES2.

Dargestellt sind die zur Klonierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Domäne verwendeten Schnittstellen BamHI. Das Restriktionsenzym EcoRI wurde verwendet, um die Lage des Inserts im Vektor zu prüfen.

Anschließend wurde der pYES2/2epi-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 transformiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich der Leervektor und ein pYES2/lacZ-Konstrukt (Invitrogen), das zur Expression der β -Galactosidase führt, transformiert. Die Selektion der transgenen Hefezellen erfolgte durch die Abwesenheit von Uracil im Medium. Der Uracil-auxotrophe Hefestamm INVSc1 kann Uracil durch einen Defekt im URA3-Gen nicht mehr selbst synthetisieren. Dieser Defekt wird durch die Anwesenheit des pYES2-Vektors, der das URA3-Gen trägt, komplementiert. Die transgenen Hefen wurden in größeren Mengen in Uracil-defizientem Medium angezogen. Bei einer OD600 von etwa 1,0 wurde mit 2% Galactose induziert, so daß das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen abgelesen werden konnte. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h nach der Galactose-Induktion wurde jeweils ein Aliquot der Hefezellen geerntet und mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand auf Enzymaktivitäten untersucht und die Anwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bzw. der β -Galactosidase in

einem SDS-Polyacrylamidgel versucht nachzuweisen. Der pYES2/*lacZ*-Vektor enthält das *lacZ*-Gen, das für die β -Galactosidase codiert, ein Enzym, das von verschiedenen Galactosederivaten hydrolytisch Galactose abspaltet. Die Aktivität dieses Enzyms kann in einem β -Gal-Assay nachgewiesen werden. In den mit dem pYES2/*lacZ*-Vektor transformierten Hefen konnte mit diesem Assay β -Galactosidase-Aktivität detektiert werden. Gleichzeitig wurden mittels Morgan-Elson-Test in den mit pYES2/2epi transformierten Hefen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten nachgewiesen. Damit läßt sich die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auch in *S. cerevisiae* als aktives Protein exprimieren. Um die maximale Proteinausbeute in Abhängigkeit von der Galactose-Induktion zu ermitteln, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots der Hefezellen geerntet und auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bzw. β -Galactosidase untersucht. Werden jeweils die gemessenen Enzymaktivitäten auf die Proteinmengen bezogen, d.h. die spezifischen Enzymaktivitäten ermittelt, so läßt sich kein Zusammenhang zwischen der Galactose-Induktionszeit und der jeweiligen spezifischen Enzymaktivität erkennen. Nach einer sechsstündigen Galactose-Inkubation konnte eine geringfügig höhere Enzymkonzentration detektiert werden als zu den anderen Zeitpunkten. Aus den jeweiligen Aktivitätsbestimmungen konnte die Menge an überexprimiertem löslichem Protein pro Liter Hefekultur ermittelt werden. Da keine Relation zwischen der Zeit der Galactose-Induktion und der spezifischen Aktivität der Enzyme beobachtet wurde, wurde dieser Wert exemplarisch für $t = 6$ h ermittelt, wo die jeweiligen Kulturen eine OD600 von etwa 3 hatten. Für die β -Galactosidase lag dieser Wert bei etwa 90 $\mu\text{g/L}$ Kultur und für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bei etwa 34 $\mu\text{g/L}$ Kultur. Die Firma Invitrogen gibt für die Expression von Proteinen in pYES-Systemen Werte von 0,1-100 mg/L an. Die Proteinexpression ist somit unter sub-optimalen Expressionsbedingungen durchgeführt worden, da die für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase erzielten Proteinmengen mit 34 $\mu\text{g/L}$ weit unter den erwarteten Werten von mindestens 100 $\mu\text{g/L}$ liegt und dieser Wert auch nicht mit der β -Galactosidase erzielt wurde. Da in den Hefezellen jedoch UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nachgewiesen wurde, wurde dieses System für die nachfolgenden Versuche verwendet.

3.4. Klonierung der Gene der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in pYES2.

Um die Mutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase in *S. cerevisiae* zu exprimieren, wurde ihre cDNA ebenfalls mittels der Restriktionsendonuklease BamHI aus dem Vektor pFastBac ausgeschnitten. Die Gene wurden in der Agarose-Gelelektrophorese vom Vektor getrennt. Die 2,2 kb-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und durch Gelelution gereinigt. Anschließend wurden die Gene in das für Hefen kompetente Plasmid pYES2/CT ligiert. Da die Umklonierung nur mit einem Restriktionsenzym erfolgte, musste die korrekte Lage des Inserts im Vektor überprüft werden. Dies geschah durch den Restriktionsverdau mit EcoRI (Abb. 9). Es befindet sich eine Schnittstelle im Insert in Position 1932 und eine weitere im Vektor in Position 2725. Daraus folgt, daß bei korrekter Positionierung des Inserts Fragmente von knapp 800 Basenpaare entstehen, bei falsch gerichteter Lage im Vektor beträgt die Größe der Fragmente ca. 1400 Basenpaare. Diese DNA-Fragmente ließen sich dann in der Agarose-Gelelektrophorese nachweisen (Abb. 10). Für jede der drei Mutanten wurde mindestens ein Klon gefunden, der die korrekte Orientierung aufwies. Des weiteren wurde durch Restriktionsverdau mit BamHI gezeigt, daß der pYES2-Vektor jeweils das komplette UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Gen mit 2,2 kb enthielt (Abb. 11).

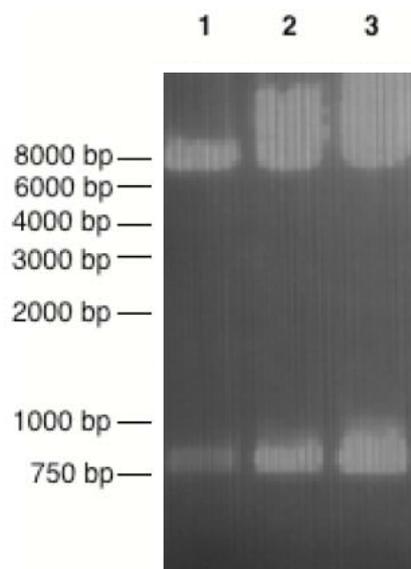


Abbildung 10: Restriktionsverdau des pYES2-Plasmids zur Kontrolle der Ligation und Analyse durch Agarosegelelektrophorese.

Dargestellt sind die Gene der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in dem Vektor pYES2 nach Restriktionsverdau durch EcoRI. (1) W204A, (2) W204F, (3) W204I. Bei korrekter Lage des Gens ist eine Bande von 800 bp zu erwarten.

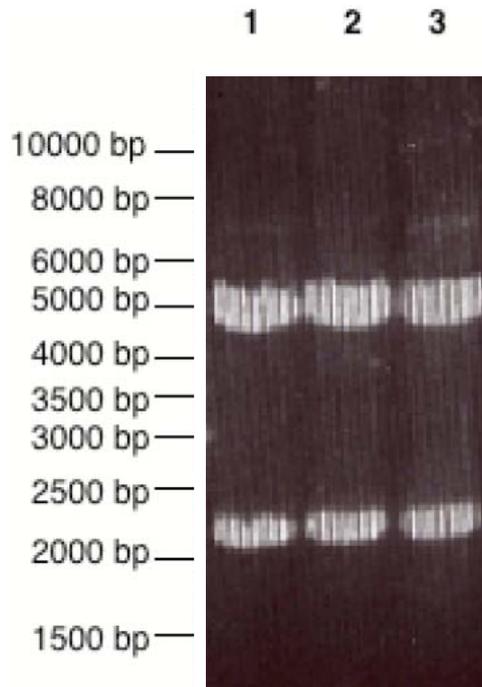


Abbildung 11: Nachweis der cDNAs für die mutierten Gene der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch Agarosegelelektrophorese.

Die mittels der Restriktionsendonuclease BamHI aus dem Vektor pFastBac ausgeschnittenen cDNAs der Mutanten W204A¹, W204I² und W204F³ besteht aus ca. 2200 Basenpaaren, der Vektor aus ca. 4800 Basenpaaren.

3.5. Expression der Mutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase in *S. cerevisiae*

Als erster Schritt erfolgte die Transformation der cDNAs sowohl der Mutanten als auch des Wildtyps in dem pYES-Vektor in Hefezellen nach der von M. Pein modifizierten Gefriermethode von R. J. Dohmen et al. (1991). Dafür wurden zunächst kompetente Hefezellen hergestellt (d. h. Zellen die fähig sind, freie zirkuläre DNA aufzunehmen) und diese mit den Plasmid-DNAs der verschiedenen Mutanten und des Wildtyps versetzt (siehe Material und Methoden). Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten mit Minimalmedium ausplattiert und vier Tage bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30°C inkubiert. Von den erhaltenen Transformanten wurden einzelne Klone als Strichkolonien auf Agar-Platten mit Minimalmedium subkultiviert. Diese Klone wurden nun wiederum in einem Schüttelinkubator vermehrt und bei einer OD600 mit 2% Galactose zur Proteinexpression induziert. Die Zellen wurden 6 h nach der Galactose-Induktion durch Zentrifugation geerntet und mit Glasperlen mechanisch

aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation von Debris und nicht aufgeschlossenen Zellen wurde in den Überständen der Gesamtproteingehalt bestimmt und Aliquots dieser cytosolischen Fraktion zur Aktivitätsbestimmung mittels des radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays eingesetzt (Tab. 1). Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Mutante W204A keinerlei Aktivität mehr aufweist. Bei der Mutante W204F zeigt sich eine deutliche, aber im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Aktivität. Die Mutante W204I schließlich weist zwar noch geringfügige Aktivität auf, welche jedoch nur knapp über der Nachweisgrenze liegt.

Tabelle 1: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase Mutanten-Klone.

Die Proteine wurden in *S. cerevisiae* exprimiert. Es wurden jeweils 4 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus diesen Experimenten.

Protein	Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität (μ U/ μ g)
Wt	25,5 \pm 15,7
Mock	<1
W204A	<1
W204F	8,2 \pm 5,1
W204I	3,2 \pm 4,2

4. DISKUSSION

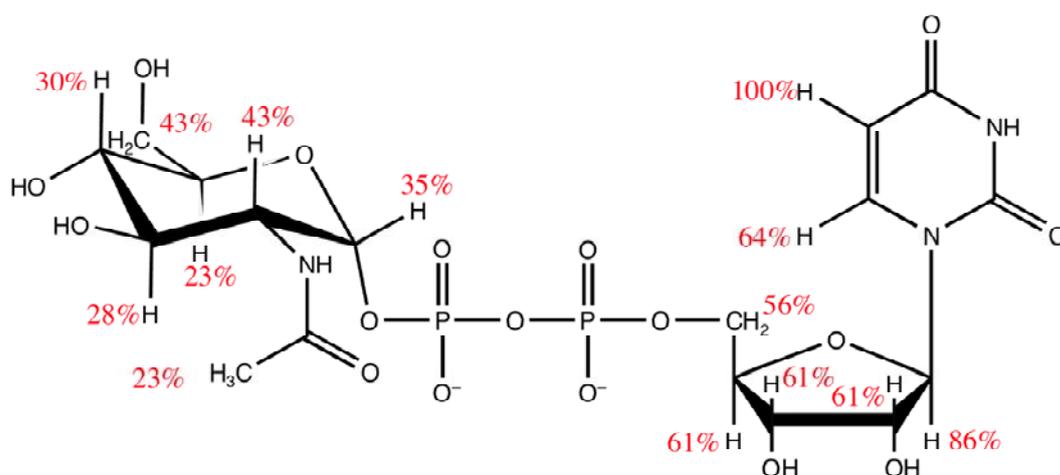
Für biochemische Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung aktiver Zentren von Proteinen ist Voraussetzung, das entsprechende Protein und Mutanten des Proteins zu exprimieren. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber sich in Insektenzellen funktionell exprimieren ließ, dies galt aber nicht für Expressionssysteme mit Bakterien- oder Hefezellen. Frühere Expressionsversuche mit Bakterien schlugen fehl, so daß es sich anbot, Expressionsversuche mit Hefezellen durchzuführen. Nach den hier gezeigten weiteren Arbeiten (Blume *et al.*, 2004) ist es mittlerweile möglich, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-ManNAc-Kinase in allen drei Systemen funktionell zu exprimieren. Damit lagen Voraussetzungen vor, das aktive Zentrum des Enzyms mittels ortsspezifischen Austauschs seines zentralen Tryptophanrests im aktiven Zentrum zu untersuchen.

Die Rolle von Tryptophan im aktiven Zentrum von Enzymen, die Zucker- beziehungsweise UDP-Zuckermoleküle binden, wurde in einigen Arbeiten untersucht. Von Interesse war hierbei besonders die Seitenkette des Tryptophans bezüglich der Wechselwirkung mit dem Pyranose- bzw. dem Furanosering oder an das Nucleotid. So hatten zum Beispiel Aktories *et al.* (2000) die Rolle eines konservierten Tryptophan-Restes in der Bindung von UDP-Glucose bei großen Cytotoxin-Glycosyltransferasen von Clostridien untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß ein Austausch von W102 mit Alanin die Aktivität der Glycosyltransferase um das 1000-Fache reduzierte, während ein Austausch mit Tyrosin nur eine Reduktion der Aktivität um das 100-Fache zur Folge hatte. Diese Ergebnisse indizierten, daß Tyrosin die Funktion des Tryptophans partiell kompensiert und daß diese Funktion darin bestehen könnte, UDP-Glucose an das große clostridiale Cytotoxin zu binden.

Eine neuere Arbeit über die Rolle von Tryptophanen im aktiven Zentrum bezüglich der Bindung von Substrat und Katalyse bei α -1,3 Galactosyltransferasen beschreibt (Zhang *et al.*, 2004), daß die Bindungsstelle für Disaccharide als Substrat von vier Tryptophanen eingekreist wird. Um ihre jeweilige Rolle bezogen auf Spezifität und enzymatische Aktivität zu untersuchen, wurden die verschiedenen Tryptophane gegen Glycin beziehungsweise gegen Tyrosin ausgetauscht. Es stellte sich heraus, daß den einzelnen Tryptophanen verschiedene Aufgaben wie Bindung oder Umsetzung des Substrates zukommen. Kristallographische Untersuchungen einzelner Mutanten ergaben aber, daß die Mutationen keinen Effekt auf die Struktur des Enzyms haben.

Da es sich bei dem Trp-204 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase um das einzige Tryptophan in der Epimerasedomäne des Enzyms handelt, ist davon auszugehen, daß es für die Enzymaktivität essentiell ist. Eine mögliche Hypothese ist, daß das Tryptophan mit seiner hydrophoben Seitenkette mit dem Zucker-Ring interagiert und diesen somit in dem aktiven Zentrum des Enzyms für die Katalyse ausrichtet. Würde dies zutreffen, so müsste eine Punktmutation der Aminosäuresequenz in dieser Position zu einem erheblichen oder kompletten Verlust der Enzymaktivität führen, je nach dem, ob die ausgetauschte Aminosäure eine Seitenkette von ähnlicher Größe und Polarität wie die des Tryptophans aufweist. Dies läßt sich durch die hier gezeigten Ergebnisse beweisen: Phenylalanin mit seinem hydrophoben Benzol-Ring weist noch deutlich messbare Aktivität auf, bei Isoleucin ist sie stark reduziert, bei Alanin ist Aktivitätsverlust komplett.

Prinzipiell scheinen zwei Möglichkeiten der Interaktion plausibel: zum einen könnte der Nucleotidzucker über den Zuckerring an die Epimerase gebunden werden oder aber über das UDP, wobei sie die wahrscheinlichere ist. Dafür sprechen vor allem Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Messungen (Blume *et al.*, 2004), mit denen ein Epitop-Mapping des Substrats UDP-Glucose möglich war. Dabei stellte sich heraus, daß die Protonen des Uracil-Ringes der Oberfläche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase am nächsten sind (siehe Abb. 12). Erstaunlicherweise wird UDP, welches ein Produkt aus der Epimerase-Reaktion ist, stärker gebunden wird als UDP-GlcNAc, welches das Substrat der Epimerase-Reaktion darstellt.



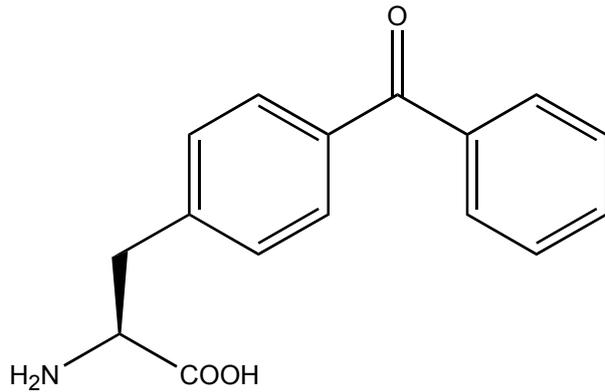
Um sichere Aussagen treffen zu können, wo genau das Substrat an der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bindet, wäre die Röntgenstrukturanalyse des Enzyms am angebrachtesten. Dieses Vorhaben wird aber durch mehrere Umstände erschwert. Zum einem ist die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nach dem Lysieren der Zellen schlecht löslich und erlaubt daher kaum, die Mengen an hochgereinigtem Protein zu gewinnen, die zur Kristallisation benötigt werden. Zum anderen bilden sich neben Hexameren auch verschiedene höhere Aggregate (D. Ghaderi, noch unveröffentlichte Dissertation), aus denen es nicht möglich ist, Kristalle zu züchten. Daher erscheint es notwendig und zweckmäßig, weitere biochemische Untersuchungen zur Struktur/Funktionsbeziehung des Enzyms anzustellen. Dazu könnten die im Folgenden geschilderten Methoden der Stellen-spezifischen Photoaffinitätsmarkierung hilfreich sein (Fischer *et al.*, 2000). Dies war bisher ausschließlich *in vitro* möglich. Seit kurzem ist dieses Konzept jedoch experimentell auch auf *in vivo*- Ansätze erweitert worden (Chin *et al.*, 2003), so daß *in vivo*-Untersuchungen zur Bindung des Substrats in der Hefe *S. cerevisiae* möglich erscheinen. Sie könnten Antworten auf die Frage liefern, wo genau das Substrat am Enzym bindet. Mit dieser Methode ist es möglich, einzelne Aminosäuren stellenspezifisch durch photoaktive Aminosäuren auszutauschen. Die Methode funktioniert ähnlich der Site-Directed-Mutagenesis, indem mittels PCR das Codon für die zu untersuchende Aminosäure durch ein amber-Stopcodon ausgetauscht wird. Die dazu notwendige amber-tRNA wird durch *in vitro*-Translation als run-off- Produkt hergestellt. Dieses kann nun mit der gewünschten Aminosäure, welche chemisch an das Diribonucleotid CA gebunden wurde, durch Ligation beladen werden (Brunner, 1993; Martoglio *et al.*, 1995). In *in vitro*-Transkriptions/Translations-Ansätzen läßt sich dann durch Zugabe der halbsynthetisch beladenen amber-Suppressor tRNA das amber-Stopcodon so effizient reprimieren, daß bis zu 50% eines *in vitro*-Translatats das „full length“-Protein mit der photolabilen Aminosäure darstellen.

Die in den letzten ein bis zwei Jahren entwickelte *in vivo*-Methode ermöglicht es, den Einbau unnatürlicher Aminosäuren genetisch zu codieren und in Proteinen der eukaryoten Zellen von *S. cerevisiae* zu exprimieren (Chin *et al.*; 2003). Dafür werden ein Codon, tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase benötigt, welche mit keiner der Komponenten der Translationsmaschienerie der Hefe kreuzreagieren. Hierfür bietet sich das amber-Suppressor- Tyrosyl-tRNA-Synthetase-tRNA_CUA Paar von *E. coli* an, da die Tyrosyl-tRNA-Synthetase von *E. coli* effizient tRNA_CUA aminoacyliert, wenn beide in dem Genom von *S. cerevisiae* codiert sind, wobei cytoplasmatischen tRNAs von *S. cerevisiae* nicht aminoacyliert werden. Des weiteren ist die Tyrosyl-tRNA_CUA ein schlechtes Substrat für die Aminoacyl-tRNA- Synthetase von *S.*

cerevisiae, wird aber prozessiert und aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert, wo es effektiv an der Proteintranslation teilnimmt. Wichtig in diesen Zusammenhang ist auch, daß die Tyrosyl-tRNA-Synthetase von *E. coli* keinen proofreading-Mechanismus besitzt und deshalb unnatürliche Aminosäuren, welche an die tRNA ligiert vorliegen, nicht ausschließt. Es wurden verschiedene Aminosäure-Seitengruppen im aktiven Zentrum der Tyrosyl-tRNA Synthetase von *E. coli*, welche sich innerhalb von 6,5 Å Entfernung von der Para-Position des Aryl-Ringes von gebundenem Tyrosin befanden, nach dem Zufallsprinzip mutiert und anschließend selektioniert (Chin *et al.*,2003).

Auf diese Art können verschiedene neuartige Aminosäure-Analoga mit bestimmten Eigenschaften, welche sich für wissenschaftliche Untersuchungen von Proteinen eignen, eingebaut werden. Zum Beispiel könnten photolabile Aminosäuren wie p-Benzoyl-L-phenylalanin oder p-Azido-L-phenylalanin (siehe Abb. 13) mit W204 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ausgetauscht werden. Diese Aminosäuren sind photolabil. Das bedeutet, daß sie nach Belichtung kovalent mit ihrer unmittelbaren Nachbarschaft reagieren. Dies ist in den meisten Fällen Wasser. Handelt es sich aber um ein organisches Molekül, das sich näher als 3 Å an der photaktivierbaren Gruppe befindet, wie ein Substrat in einem Enzym-Substrat-Komplex, so wird dieses kovalent gebunden. Hierbei bietet das Benzoyl-phenylalanin-Derivat den Vorteil, nach Photoreaktion mit Wasser dieses wieder abzuspalten, wodurch sein photoaktivierbarer Zustand regeneriert wird. Ein solcher Ansatz erscheint umso vielversprechender, als nach den hier beschriebenen Ergebnissen der Aktivitätserhalt des Enzyms nach Substitution des W204 umso größer ist, je unpolarer und größer die substituierende Seitenkette ist. Die Reaktion mit dem Substrat kann dann durch Peptide-Mass-Fingerprint analysiert werden. Dazu werden die Zellen nach Photoreaktion lysiert und UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase immunpräzipitiert. Nach Auftrennung des Immunpräzipitats durch SDS-Gelelektrophorese kann das Protein im Gel verdaut und anschließend eine Interaktion zwischen der photolabilen Aminosäure in der Position 204 mit dem Substrat mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Dazu dient das Auftreten eines Signals, dessen Masse sich aus der molekularen Masse eines Peptides um die Position 204, entsprechend der Spezifität der verwendeten Protease, plus der Masse des Substrates UDP-N-Acetylglucosamin oder UDP zusammensetzt. Der Anteil des Substratmoleküls, der mit der Position 204 interagiert, kann dann möglicherweise in einem Tandem-Massenspektrometer nach Fragmentierung nachgewiesen werden.

a)



b)

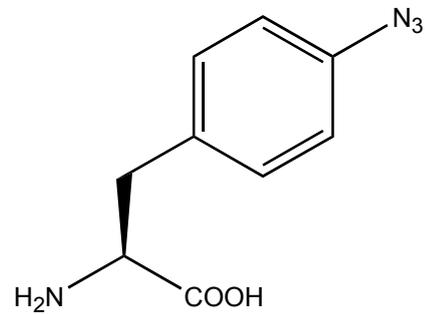


Abbildung 13: Die Strukturformeln der unnatürlichen Aminosäuren p-Benzoyl-L-phenylalanin (a) und p-Azido-L-phenylalanin (b).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Da die essentielle Aminosäure Tryptophan in dem Epimerase-Anteil der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nur einmal vorkommt und Arbeiten an bakteriellen Glycosyltransferasen gezeigt haben, daß Tryptophan für die mit seiner hydrophoben, polaren Seitenkette für die Bindung von Zuckermolekülen oder UDP geeignet zu sein scheint, lag es nahe anzunehmen, daß W204 für den Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von Bedeutung ist.

Mittels Site-Directed-Mutagenesis wurde W204 jeweils gegen die Aminosäuren Phenylalanin, Isoleucin und Alanin ausgetauscht und die Enzymaktivität gemessen. Der Versuch, W204 gegen Histidin auszutauschen, schlug trotz vielfacher Versuche fehl, da sich das Codon an dieser Stelle, vermutlich aufgrund der zu niedrigen Schmelztemperatur des DNA-Stranges, nicht in das Genom der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase einfügen ließ.

Ersatz von Tryptophan durch Alanin schaltete die Enzymaktivität völlig aus. Mit Phenylalanin anstelle von Tryptophan war noch Aktivität nachweisbar, was sich wahrscheinlich durch die an Polarität und Größe dem Tryptophan nahe kommende Ähnlichkeit erklärt. Für Isoleucin ist es

fraglich, ob die geringe Aktivität, die noch nachgewiesen wurde, reell ist, oder ob sie durch Hintergrundstrahlung oder ähnliche Störfaktoren in den Messungen zustande kam.

6. MATERIALIEN UND METHODEN

6.1. Materialien

6.1.1. Vektoren

pYES2 Invitrogen (Niederlande)

pFastBac GibcoBRL (USA)

6.1.2. Bakterienstamm

INV£F': F- *endA1 recA1 hsdR17* (rk-, mk+) *supE44 thi-1 gyrA96*

6.1.3. Hefestamm

INVSc1: *MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*

6.1.4. Medien und Kultivierung der Zellen

Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wird destilliertes entionisiertes Wasser verwendet. Stammlösungen und Flüssigmedien für die sterile Anzucht werden 20 min bei 200 kPa autoklaviert bzw. hitzelabile Lösungen sterilfiltriert (Satorius- Membranfilter, Porengröße 0,2µm).

6.1.4.1. Bakterien

Bakterien werden bei 37 °C im Schüttelinkubator (225 rpm; Novotron; Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Model B; Memmert, Deutschland) kultiviert. Bakterien können bei –80 °C eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Kulturen bis zur Sättigung angezogen, Glycerin bis zu einer Konzentration von 20% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei –80 °C gelagert werden. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut werden und in Medium resuspendiert werden.

LB-Medium: 10 g/l Pepton (GibcoBRL, USA)

5 g/l Hefeextrakt (GibcoBRL, USA)

10 g/l NaCl

15 g/l Agar (nur bei Festmedien)

SOC-Medium: 20 g/l Pepton (GibcoBRL, USA)

5 g/l Hefeextrakt (GibcoBRL, USA)

0,5 g/l NaCl

4 g/l MgCl₂

3,6 g/l Glucose

186 mg/l KCl

.

Nach dem Autoklavieren wird bei Selektivmedien noch 50 mg/ml Ampicillin zugegeben.

6.1.4.2. Hefen

Hefezellen werden bei 30 °C im Schüttelinkubator (140 rpm; RFI-150; Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert. Hefen können bei –80 °C eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Hefekulturen über Nacht angezogen, auf eine berechnete Zelldichte von OD₆₀₀ 50-100 eingestellt, Glycerin mit einer Konzentration von 15% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei –80 °C gelagert werden. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut werden und in Medium resuspendiert werden.

YPD-Medium: 20 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Agar (nur bei Festmedien)

Nach dem Autoklavieren wird noch folgende Lösung zugegeben:

100 ml/l 20% (w/v) Glucose

***Saccharomyces cerevisiae*:**

Minimalmedium: 1,155 g/l Dropout-Powder (s.u.)

(Uracil-) 20 g/l Bacto-Agar (nur bei Festmedien)

Nach dem Autoklavieren werden noch folgende Lösungen zugegeben:

100 ml 20% Raffinose

10 ml Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Difco), 6,7 g / 100 ml

8,3 ml Histidin, 240 mg / 100 ml

8,3 ml Leucin, 720 mg / 100 ml

8,3 ml Tryptophan, 480 mg / 100 ml

Dropout-Powder: 2,5 g Adenin (Hemisulfat)

1,2 g L-Arginin (HCl)

6,0 g L-Asparat

6,0 g L-Glutamat (Na-Salz)

1,8 g L-Lysin (HCl)

1,2 g L-Methionin

3,0 g L-Phenylalanin

22,5 g L-Serin

12,0 g L-Threonin

1,8 g L-Tyrosin

9,0 g L-Valin

(enthält kein Uracil, Histidin, Tryptophan und Leucin)

6.1.5. Primer

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Deutschland) bezogen.

Mutagenese-Primer: Veränderte Nukleotide sind unterstrichen.

W204A 5'-GC ATC ATT CGG ATG GCG CTA GGT GAT GAT GTA AAT G-3'
W204F 5'-GC ATC ATT CGG ATG TTC CTA GGT GAT GAT GTA AAT G-3'
W204H 5'-GC ATC ATT CGG ATG CAC CTA GGT GAT GAT GTA AAT G-3'
W204I 5'-GC ATC ATT CGG ATG ATT CTA GGT GAT GAT GTA AAT G-3'

Sequenzier-Primer:

pFastBac 5'-CCC CGG ATG AAG TGG TTC G-3' 5' IRD 800

42f 5'-CTG ATA CAG GAG TGG AA-3' 5' IRD 800

53f 5'-GTG ATC AAC CTG GGC AC-3' 5' IRD 800

64f 5'-CAG CCA TGG TAG AGT CAG TG-3' 5' IRD 700

6.1.6. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma (Deutschland), Roth (Deutschland), ICN (Deutschland), Roche (Deutschland), Calbiochem (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen. Enzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von GibcoBRL (USA) bezogen.

6.1.7. Geräte

Cleanbench FASTER 1 BioFlow-Technik

Uniflow UVUB 1200 Kendro

Gel-Dokumentations-Apparatur Gel-Print 2000i MWG-Biotech

Filmentwicklungsmaschine Curix 60 Agfa AG

Flachbettgelelektrophoresekammer B1A, B2 BioRad

Kühlzentrifuge Centricon H-401 Kontron Instr.

Mikroskop TMS Nikon

Power-Supply Power-Pac 1000 BioRad

SDS-PAGE-System Mini-Protreat II BioRad

Spektralphotometer Ultrospec 3000 Pharmacia

Thermoblock Thermomixer Compact Eppendorf

Tischzentrifuge Biofuge 13 Heraeus

Zentrifuge Megafuge 1.0 Heraeus

6.2. Methoden

6.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

6.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen werden mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Deutschland) durchgeführt. Die Methode geht auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zurück. Für eine Mini-Plasmidpräparation (30-50 µg DNA) werden von einer *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium 2 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 20000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wird in 200 µl Puffer I, versetzt mit 100 mg/l RNase A, unter leichtem Vortexen gut resuspendiert. Anschließend werden 200 µl Puffer II zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken wird der Ansatz gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die stark alkalische Pufferlösung II lysiert die Zellen und setzt dadurch die Plasmid-DNA frei. Nach Zugabe von 200 µl des Neutralisations-Puffers III wird der Ansatz mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 20000 x g werden die zellulären Proteine und die chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wird nochmals für 15 min zentrifugiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA im Überstand mit 450 µl (0,7 Volumen) 2-Propanol gefällt und nach 30-minütiger Inkubation bei -20 °C durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g pelletiert. Um restliche Salze zu entfernen, wird das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 30 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris- HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert. Um größere Mengen (100 bzw. 500 µg) High-Copy-Plasmid-DNA zu isolieren, werden 25 ml bzw. 100 ml *E. coli*-Übernachtskulturen angesetzt und das Plasmid wie oben beschrieben isoliert. Bevor die Plasmid-DNA mit 2-Propanol gefällt wird, erfolgt bei diesen Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparationen eine weitere Reinigung der DNA über ein Anionen-Austauscher-Harz, an das Plasmid-DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert bindet. Verunreinigungen, wie z.B. Proteine, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Mit Hochsalzpuffer wird die Plasmid-DNA eluiert, durch 2-Propanol gefällt und mit

kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Das Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 60 µl bzw. 150 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

6.2.1.2. Fällung von DNA

DNA lässt sich durch Ethanol oder 2-Propanol fällen. Dafür werden 2 Volumina 2-Propanol bzw. 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,8, und 2,5 Volumina Ethanol zugegeben, der Ansatz durch vortexen gut gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Die gefällte DNA wird anschließend 10 min bei 20000 x g pelletiert und das Pellet mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wird in 5-20 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen.

6.2.1.3. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen werden spektralphotometrisch durch Absorptionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht dabei 50 µg Doppelstrang-DNA/ml Lösung. Wird gleichzeitig die Absorption bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, so kann aus dem Verhältnis 260 nm zu 280 nm die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Saubere DNA ist frei von Proteinen und RNA und hat ein Verhältnis der Wellenlängen 260 nm / 280 nm von ca. 1,8. Eine weitere Möglichkeit DNA-Mengen zu quantifizieren, besteht in der Abschätzung der Bandenintensität auf Agarosegelen, im Vergleich zu bekannten DNA-Mengen.

6.2.1.4. DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 bp und führen in doppelsträngige DNA Strangbrüche ein, wobei überhängende 3' bzw. 5' Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt end) entstehen. Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wird für die Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. Restriktionsspaltungen werden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthält zwischen 1 und 40 µg DNA. Pro Restriktionsansatz

werden etwa eine Einheit (U) Enzym pro μg DNA eingesetzt. Anschließend werden die erhaltenen Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

6.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Bei ringförmiger DNA können auch *coiled-* und *supercoiled-*Strukturen auftreten, welche aufgrund ihrer höheren Kompaktheit schneller wandern und in den Gelen deshalb bei scheinbar kleineren Molekulargewichten detektiert werden. Mit Agarosegelen können DNA-Moleküle im Bereich von 500-8000 bp identifiziert werden. Agarose-Gelelektrophoresen werden zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von DNA verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in horizontalen 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose wird durch Kochen in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl / 5 mM Natriumacetat / 1 mM EDTA, pH 7,9) gelöst und in die entsprechenden Gelschlitten gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400 / 1% (w/v) SDS / 0,02% (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer) versetzt. Das Auftragsvolumen beträgt etwa 5-20 μl pro Probenflasche. Als Größenstandard werden 10 μl des 1 kb-DNA-Markers (Gibco-BRL, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese wird anschließend bei 0,5 V / cm^2 durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hat. Das Gel wird dann für 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid in TAE-Puffer) inkubiert und die DNA unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

6.2.1.6. Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution

DNA kann aus Agarose-Gelen durch Verflüssigung der Agarose in Spezialpuffer herausgelöst und anschließend über QIAgen-Säulen des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Deutschland) gereinigt werden. Der im Kit enthaltene Puffer QG ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen. Gleichzeitig führen die im Puffer enthaltenen Salze

zu einer leichten Modifikation der Nucleinsäure-Struktur, so daß anschließend eine optimale Bindung an die Silicagel-Membran der Säulen möglich ist. Die DNA-Bindung an das Säulenmaterial ermöglicht die Reinigung von unerwünschten Primern und Verunreinigungen, wie Salzen, Enzymen, nicht inkorporierte Nucleotiden, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen oder Detergenzien durch den ethanolhaltigen PE-Puffer. Die Elution erfolgt anschließend mit 30 µl Wasser. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

6.2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Bei der Standardligation wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektor mit isolierten DNA-Fragmenten verknüpft, die durch Restriktionsspaltung und anschließende Gelelektrophorese mit Gelelution isoliert worden sind. Für die Ligation werden Vektor und Insert im Verhältnis von mindestens 1:3 eingesetzt. Der Ansatz wird mit 1 µl T4-DNA Ligase (20 U; GibcoBRL, USA) pro 10 µl Ansatz bei RT für 5-15 min inkubiert und anschließend vollständig zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

6.2.1.8. Dephosphorylierung von DNA

Linearisierte Vektoren, deren Enden symmetrisch sind, zeigen eine hohe Religationsrate. Um bei Religationen mit DNA-Fragmenten die Selbstligationsrate des Vektors zu verringern, wird vorher das linearisierte Plasmid mit bakterieller alkalischer Phosphatase aus *E. coli* behandelt. Diese alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe von DNA, die bei Ligationen als Energielieferant benötigt wird, wodurch die Religationsrate des Vektors stark verringert wird. Die Dephosphorylierung der DNA wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers (GibcoBRL, USA) durchgeführt. Die in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, gelöste DNA (1 pmol) wird nach der Zugabe von 1 µl bakterieller alkalischer Phosphatase 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die DNA mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Deutschland) gereinigt und in 20 µl Wasser aufgenommen.

6.2.1.9. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind Zellen, die fähig sind, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Durch Behandlung mit CaCl_2 wird die Zellmembran für DNA-Moleküle durchlässig (Dagert und Ehrlich, 1979). Zur Herstellung von kompetenten Zellen werden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von $\text{Inv}\alpha/\text{F}'$ angeimpft und bei 37°C bis zur Sättigung kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wird in 100 ml LB überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,3 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 5 min, 4°C) sedimentiert und in 20 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wird 5 min bei $3000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert und nochmals für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen werden direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 20% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

6.2.1.10. Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien bezeichnet. Dabei wird zu 100 μl kompetenten Zellen der Ligationansatz oder etwa 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Proben werden anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Durch die nachfolgende 45-sec- Inkubation bei 42°C im Wasserbad wird die Aufnahme der DNA durch die Bakterienzellen erleichtert. Die Zellen werden anschließend nochmals 2 min auf Eis inkubiert und danach in 250 μl LB-Medium oder alternativ SOC-Medium für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert, damit sich die Bakterienzellen regenerieren können. Aliquots von 50 bis 200 μl werden auf vorgewärmten Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.1.11. Sequenzanalyse

Zur Kontrolle von Klonierungsschritten und zur Sequenzanalyse generell werden Sequenzierungen durchgeführt. Alle Sequenzierungen werden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1992) durchgeführt. Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimern werden 4 pmol Sequenzierprimer mit 1,2 μg DNA auf vier Nukleotidmische („Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit“; Amersham, Deutschland) verteilt und die

Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 6 µl einem Cycle-Sequencing mit 25 Zyklen (20 sec 95°C / 20 sec 60 °C / 10 sec 72°C) unterzogen. Anschließend wird 1 µl des zuvor mit 4 µl Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200; MWG-Biotech, Deutschland) analysiert.

6.2.1.12. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann eine ausgewählte DNA-Sequenz *in vitro* exponentiell amplifiziert werden, z.B. um die Anwesenheit eines bestimmten DNA-Fragments nachzuweisen. Zur Synthese werden eine DNA-Sequenz, die als Template bezeichnet wird, und zwei Oligonukleotidprimer benötigt, die die zu amplifizierende Region flankieren. Die PCR wird mit dem „AmpliTaq DNA Polymerase with GeneAmp Kit“ (Perkin Elmer, USA) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Ein Standardansatz für eine PCR sieht dabei wie folgt aus:

Template 10-100 ng

Primer je 20 pmol

dNTPs je 2 mM

MgCl₂ 1,5 mM

Puffer 10 x PCR-Buffer II

Taq-Polymerase 0,5 µl/50 µl Ansatz

Die Reaktion wird in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid) mit folgendem Programm durchgeführt:

3 min 95 °C

30 x (30 sec 95 °C / 30 sec 55 °C / 2 min 72 °C)

7 min 72 °C

Ein Aliquot von 5 µl wird zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

6.2.1.13. Herstellung von Punktmutanten

Zur Generierung von Mutanten wird der „QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis Kit“ von Stratagene (USA) eingesetzt. Zur Konstruktion jeder Mutante sind zwei zueinander revers

komplementäre Oligonukleotidprimer erforderlich, die die gewünschte Mutation möglichst mittig tragen. Die Primersequenzen sind unter Materialien/Primer (2.1.6) beschrieben. Als Template-DNA dient der pFASTBACHTA/2epi-Vektor, der ausgehend von den Mutationsprimern von der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase repliziert wird. Die Amplifikationsreaktionen werden in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

30 sec 95 °C

16 x (30 sec 95 °C / 1 min 55 °C / 14 min 68 °C)

Anschließend wird die parentale Template-DNA mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* abgebaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA abbaut (1 h, 37 °C, 10 U). Die amplifizierte DNA mit den Mutationen wird in superkompetente Inv α /F' Zellen (Invitrogen, Niederlande) transformiert.

6.2.2. Expression von rekombinantem Protein in *S. cerevisiae*

Die Überexpression von rekombinantem Protein in der Hefe *S. cerevisiae* erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers des Expressionsvektors pYES2 (Invitrogen, Niederlande). Sämtliche Expressionsexperimente werden mit dem Hefestamm INVSc1 (Invitrogen, Niederlande) durchgeführt.

6.2.2.1. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Hefezellen

Für die Aufnahme von Fremd-DNA durch die Hefezellen werden zunächst kompetente Zellen hergestellt. Dafür werden 5 ml Vollmedium mit einer Einzelkolonie von INVSc1 angeimpft und bei 30 °C bis zur Sättigung kultiviert. 4 ml dieser Vorkultur werden in 100 ml Vollmedium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4 °C) sedimentiert und mit 20 ml 1 M Sorbitol / 10 mM Tricin-NaOH, pH 8,4 / 3% (v/v) Ethylenglycol gewaschen. Die sedimentierten Zellen werden in 4 ml 1 M Sorbitol / 10 mM Tricin-NaOH, pH 8,4 / 3% (v/v) Ethylenglycol resuspendiert und mit 100 μ l zerschallter Heringssperma-DNA (10 mg/ml, zerschallt auf eine mittlere Fragmentgröße von 7 kb) sowie mit 100 μ l einer sterilfiltrierten 1 M Histamin-Lösung versetzt. Aliquots von 200 μ l werden bei -70 °C für mindestens 2 h eingefroren.

6.2.2.2. Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Organismen bezeichnet. Die *S. cerevisiae*-Zellen werden mittels der von M. Pein modifizierten Gefriermethode von R.J. Dohmen *et. al.* (1991) transformiert. Dafür werden die gefrorenen kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen mit 2,5 µg Plasmid-DNA versetzt. Alle Ansätze werden 5 min bei 37 °C geschüttelt, mit 1,2 ml 40% (v/v) PEG 3350 (Sigma) / 200 mM Tricin-NaOH, pH 8,4, gemischt und ohne weiteres Schütteln 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach Sedimentation bei 13000 x g für 5 sec werden die Zellen zweimal mit je 1 ml 0,15 M NaCl / 10 mM Tricin-NaOH, pH 8,4, gewaschen, anschließend in 200 µl 0,15 M NaCl/10 mM Tricin-NaOH, pH 8,4, aufgenommen, auf Agar-Platten mit Minimalmedium ausplattiert und etwa 4 Tage bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30 °C inkubiert. Von den erhaltenen Transformanten werden einzelne Klone als Strichkolonien auf Agar-Platten mit Minimalmedium subkultiviert und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

6.2.2.3. Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zunächst Pilotexpressionen durchgeführt. Einzelne Klone werden in 5 ml Minimalmedium bis zur Sättigung bei 30 °C kultiviert. Mit 500 µl dieser Vorkultur werden 50 ml Minimalmedium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C kultiviert. Durch Zugabe von 2% (w/v) Galactose wird die Proteinexpression induziert. Um die optimalen Bedingungen für maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 5 ml Aliquots abgenommen, die OD₆₀₀ ermittelt und die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert. Der Medienüberstand und die Zellen werden bis zur weiteren Analyse bei -70 °C gelagert, wobei die Zellen zuvor noch mit 500 µl Wasser gewaschen werden. Die gefrorenen Zellen werden in Lysepuffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert, so daß eine berechnete OD₆₀₀ von 50-100 eingestellt wird. Anschließend wird ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben. Die Zellsuspension wird für 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wird siebenmal wiederholt, damit die Zellen komplett lysiert sind. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten

werden im Anschluß bei 20000 x g und RT für 10 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in 50 µl SDS-Probenpuffer (s. 2.2.6.3) resuspendiert.

6.2.2.4. Expression von rekombinantem Protein in *S. cerevisiae*

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Einzelne Kolonien werden in 5 ml Minimalmedium bis zur Sättigung bei 30 °C kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur werden 100 ml Minimalmedium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C kultiviert. Durch Zugabe von 2% (v/v) Galactose wird die Proteinexpression induziert. Nach 6 h werden die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert und das Zellpellet bei -20 °C gelagert oder direkt lysiert, indem die Zellen in 1 ml Lysepuffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert werden und ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben wird. Die Zellen werden, wie unter 2.2.3.3 beschrieben, mechanisch durch Scherkräfte aufgebrochen und Zelltrümmer und unlösliche Komponenten bei 20000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

6.2.2.5. Lyse von Hefezellen

Die geernteten Hefezellen von 1 ml Hefekultur werden in 100 µl Lysepuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM DTT / 1 mM EDTA / 1 mM PMSF) resuspendiert und ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben. Die Zellsuspension wird für 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wird achtmal wiederholt, damit die Zellen komplett lysiert sind. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und den gleichen Analysen unterzogen.

6.2.3. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

6.2.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillantblau mit Proteinen unter Komplexbildung reagiert. 20 µl proteinhaltige Probe werden mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (v/v) Phosphorsäure / 5% (v/v) Ethanol / 0,1% (w/v) Coomassie G-250) versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 578 nm bestimmt. Als Proteinstandard dient Rinderserumalbumin.

6.2.3.2. UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays

Zum Nachweis der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität werden zum einen der nichtradioaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay mit anschließendem colorimetrischen Nachweis des entstandenen ManNAc zum anderen der sehr viel empfindlichere radioaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay durchgeführt. Nichtradioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 1: 100 µl Probe/Wasser werden mit 45 µl 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 45 µl 50 mM MgCl₂ und 2,5 µl 100 mM UDP-GlcNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch 1-minütige Inkubation bei 100 °C gestoppt. Die denaturierten Proteine aus dem Enzymreaktionsansatz werden durch Zentrifugation bei 20000 x g für 1 min pelletiert. Das entstandene ManNAc wird mittels Morgan-Elson-Test (Reissig et al., 1955), mit dem spezifisch *N*-Acetylhexosamine detektiert werden, nachgewiesen. Nach der Zentrifugation werden 150 µl des Überstandes mit 30 µl 0,8 M H₂BO₃-Puffer, pH 9,1 (mit KOH eingestellt), gemischt und für 3 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend werden 800 µl Farbreagenz (1% (w/v) 4-Dimethylaminobenzaldehyd / 1,25% (v/v) 10 M HCl in Essigsäure) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wird bei 578 nm gemessen. Nichtradioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 2: Für einige zeitabhängige Aktivitätsmessungen wird ein modifizierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay verwendet. In diesem Epimerase-Assay 2 werden unterschiedliche Probenvolumina mit 260 µl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl, 10 µl 100 mM UDP-GlcNAc, 40 µl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 20 µl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 µl Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehydrogenase (2 U) in einem Gesamtvolumen von 800 µl gemischt. Die Enzymreaktion wird bei 37 °C im Photometer bei 340 nm verfolgt. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne Enzym gemessen und die ermittelten Werte später von den Werten der Enzymreaktion abgezogen. Radioaktiver UDP-GlcNAc-2-

Epimerase-Assay: Beim radioaktiven Assay werden zusätzlich zu den Komponenten des nichtradioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase- Assays 1 12,5 nCi UDP-[¹⁴C]-GlcNAc in den Enzymreaktionsansatz gegeben. In der Regel wird die Enzymreaktion für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend werden 350 µl Ethanol zugegeben, wodurch die Proteine denaturiert werden, d.h. die Reaktion gestoppt wird. Das entstandene ¹⁴C-ManNAc wird durch absteigende Papierchromatographie von UDP-[¹⁴C]-GlcNAc abgetrennt. Die Proben werden auf Whatman 3MMChr-Chromatographiestreifen (Herolab, Deutschland) von 2 x 48 cm aufgetragen. Die Chromatographie wird für 16-20 h mit 70% 1-Propanol / 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, durchgeführt. Die getrockneten Chromatographiestreifen werden anschließend in 2,5 cm lange Stücke geschnitten und die Radioaktivität mit 5 ml Ultima Gold XR (Packard, Niederlande) in einem Tri-Carb 1900 CA Flüssigszintillationszähler (Packard, Niederlande) bestimmt. Der R_f-Wert für UDP-GlcNAc und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,08 bzw. 0,55.

LITERATUR

Angata, T., und Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 102, 439-69

Bhavanandan, V. P. (1991). Cancer-associated mucins and mucin-type glycoproteins. *Glycobiology* 1, 493-503.

Blume A, Benie AJ, Stolz F, Schmidt RR, Reutter W, Hinderlich S, Peters T (2004) Characterization of ligand binding to the bifunctional key enzyme in the sialic acid biosynthesis by NMR: I. Investigation of the UDP-GlcNAc 2-epimerase functionality. *J Biol Chem.* 279, 55715-21.

Blume A, Ghaderi D, Liebich V, Hinderlich S, Donner P, Reutter W, Lucka L. (2004) UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, functionally expressed in and purified from *Escherichia coli*, yeast, and insect cells. *Protein Expr Purif.* 35,387-96.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkine extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523

Brunner J. (1993). New photolabeling and crosslinking methods. *Annu Rev Biochem.* 62, 483-514

Bruses, J. L., und Rutishauser, U. (2001). Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 83, 635-43.

- Cardini, C. E., und Leloir, L. F. (1957). Enzymatic formation of acetylgalactosamine. *J Biol Chem* 225, 317-24.
- Cheer, S. M., und Wagstaff, A. J. (2002). Zanamivir: an update of its use in influenza. *Drugs* 62, 71-106.
- Colli, W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 7, 1257-64.
- Comb, D. G., und Roseman, S. (1958a). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* 232, 807-27.
- Corfield, A. P., Clamp, J. R., und Wagner, S. A. (1985). The metabolism of sialic acids in isolated rat colonic mucosal cells. *Biochem J* 226, 163-74.
- Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23-28
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W. M., Höner, C. B., Hollenberg, C.P. (1991) An efficient transformation procedure enabling longterm storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7, 691-692
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., und Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7572-6.
- Effertz, K., Hinderlich, S., und Reutter, W. (1999). Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *J Biol Chem* 274, 28771-8.
- Egrie, J. C., und Brown, J. K., (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 16, 3-13.
- Emig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M., und Buchner, K. (1995). The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *J Biol Chem* 270, 13787-93.
- Enns, G. M., Seppala, R., Musci, T. J., Weisiger, K., Ferrell, L. D., Wenger, D. A., Gahl, W. A., und Packman, S. (2001). Clinical course and biochemistry of sialuria. *J Inherit Metab Dis* 24, 328-36.
- Ferreira, H., Seppala, R., Pinto, R., Huizing, M., Martins, E., Braga, A. C., Gomes, L., Krasnewich, D. M., Sa Miranda, M. C., und Gahl, W. A. (1999). Sialuria in a Portuguese girl: clinical, biochemical, and molecular characteristics. *Mol Genet Metab* 67, 131-7.
- Fischer Kirk D., J. Bernd Helms, Liyun Zhao and Felix T. Wieland (2000). Site-Specific Photocrosslinking to Probe Interactions with Arf1 with Proteins involved in Budding of COPI Vesicles. *Methods* 20, 455-64

- Ghaderi, D., Strauss, H. M., Reinke S., Cirak, S., Reutter W., Lucka, L., Hinderlich S. (2007). Evidence for Dynamic Interplay of Different Oligomeric States of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine Kinase by Biophysical Methods. *J. Mol. Biol.*
- Ghosh, S., und Roseman, S. (1965). The sialic acids. V. N-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J Biol Chem* 240, 1531-6.
- Hakomori, S. (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 52, 257-331.
- Harms, E., Kreisel, W., Morris, H. P., und Reutter, W. (1973). Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in Morris hepatomas. *Eur J Biochem* 32, 254-62
- Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D. G., und Crocker, P. R. (2001). Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* 97, 288-96.
- High S, Martoglio B, Görlich D, Andersen SS, Ashford AJ, Giner A, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA, Dobberstein B, et al.(1995) Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem.*268:26745-51
- Hinderlich, S., Stäsche, R., Zeitler, R., und Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272, 24313-8.
- Hoffman, S., und Edelman, G. M. (1983). Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5762-6.
- Horstkorte, R., Nöhring, S., Wiechens, N., Schwarzkopf, M., Danker, K., Reutter, W., und Lucka, L. (1999). Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Eur J Biochem* 260, 923-7.
- Horstkorte, R., Nöhring, S., Danker, K., Effertz, K., Reutter, W., und Lucka, L. (2000). Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* 470, 315-8.
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., und Suzuki, A. (1998). The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 273, 15866-71
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G., und Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72, 7367-73.
- v. Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363, 401-2

- Jason, W., Chin, T., Ashton Cropp, J. christopherAnderson, Mridul Mukherji, Zhiwen Zhang, Peter G. Schultz (2003). An Expanded Eukariotic Genetic Code. *Science* 15, 964-66.
- Kamerling, J. P., Strecker, G., Farriaux, J. P., Dorland, L., Haverkamp, J., und Vliegenthart, J. F. (1979). 2-Acetamidoglucal, a new metabolite isolated from the urine of a patient with sialuria. *Biochim Biophys Acta* 583, 403-8.
- Kayser, H., C.C.Geilen, C. Paul, R. Zeitler, W. Reutter (1992). Incorporation of N-acyl-amino-2-deoxy-hexoses into glycosphingolipids of the pheochromocytoma cell line PC 12. *FEBS Lett.* 301, 137-40.
- Kayser, H., Zeitler, R., Kannicht, C., Grunow, D., Nuck, R., und Reutter, W. (1992). Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* 267, 16934-8.
- Kelm, S., und Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 175, 137-240.
- Keppler, O., R. Horstkorte, M Pawlita, C Schmidt, W. Reutter (2001). Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology* 11, 11R-18R.
- Keppler, O. T., Hinderlich, S., Langner, J., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., und Pawlita, M. (1999). UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* 284, 1372-6.
- Kluge, A., Reuter, G., Lee, H., Ruch-Heeger, B., und Schauer, R. (1992). Interaction of rat peritoneal macrophages with homologous sialidase-treated thrombocytes in vitro: biochemical and morphological studies. Detection of N-(O-acetyl)glycolylneuraminic acid. *Eur J Cell Biol* 59, 12-20.
- Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E., und O'Brien, P. J. (1964). The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 52, 371-9.
- Krauss, J. H., Himmelspach, K., Reuter, G., Schauer, R., und Mayer, H. (1992). Structural analysis of a novel sialic-acid-containing trisaccharide from *Rhodobacter capsulatus* 37b4 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 204, 217-23.
- Kundig, W., Gosh, S., und Roseman, S. (1966). The sialic acids. VII. N-Acyl-D-mannosamine kinase from rat liver. *J Biol Chem* 241, 5619-26.
- Leroy, J. G., Seppala, R., Huizing, M., Dacremont, G., De Simpel, H., Van Coster, R. N., Orvisky, E., Krasnewich, D. M., und Gahl, W. A. (2001). Dominant inheritance of sialuria, an inborn error of feedback inhibition. *Am J Hum Genet* 68, 1419-27.
- Lucka, L., Krause, M., Danker, K., Reutter, W., und Horstkorte, R. (1999). Primary structure and expression analysis of human UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 454, 341-4.

- Mahal, L.K., Yarema, K.J. und Bertozzi, C.R. (1997). Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* 276, 1125-8
- Malykh, Y. N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E. B., Shaw, L., und Schauer, R. (1999). The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj J* 16, 731-9
- Ofek, I., und Sharon, N. (1990). Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 151, 91-113
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* 217, 959-966
- Rens-Domiano, S., und Reisine, T. (1991). Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors. *J Biol Chem* 266, 20094-102.
- Richards, R. L., Moss, J., Alving, C. R., Fishman, P. H., und Brady, R. O. (1979). Cholera toxin (cholera toxin): a bacterial lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1673-6.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., und Gehring, W. J. (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*.
- Roth, J., Zuber, C., Wagner, P., Taatjes, D. J., Weisgerber, C., Heitz, P. U., Goridis, C., und Bitter-Suermann, D. (1988). Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2999-3003
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977 (classical article). *Biotechnology* 24, 104-108
- Schengrund, C. L., DasGupta, B. R., und Ringler, N. J. (1991). Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J Neurochem* 57, 1024-32.
- Schlepper-Schäfer, J., Kolb-Bachofen, V., und Kolb, H. (1980). Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupffer cells. *Biochem J* 186, 827-31.
- Schwarzkopf, M., Knobloch, K. P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., und Horstkorte, R. (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5267-5270.
- Shaw, L., und Schauer, R. (1988). The biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369, 477-86.
- Seppala, R., Tietze, F., Krasnewich, D., Weiss, P., Ashwell, G., Barsh, G., Thomas, G. H., Packman, S., und Gahl, W. A. (1991). Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J Biol Chem* 266, 7456-61.

Seppala, R., Lehto, V. P., und Gahl, W. A. (1999). Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. *Am J Hum Genet* 64, 1563-9.

Weiss, P. und Ashwell, G. (1989). Ligand induced modulation of the hepatic receptor for asialglycoproteins. Evidence for the role of hyposialylation. *Biol Chem* 264: 11572-4.

Sommar, K. M., und Ellis, D. G. (1972b). Uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from rat liver. II. Studies on the mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 268, 590-5.

Stäsche, R., Hinderlich, S., Weise, C., Effertz, K., Lucka, L., Moormann, P., und Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272, 24319-24.

Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R. E., Jr., Chambers, T. M., Kiso, M., Ishida, H., und Kawaoka, Y. (2000). Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 74, 11825-31.

Tanner, M. E. (2002). Understanding Nature's Strategies for Enzyme-Catalyzed Racemization and Epimerization. *Acc Chem Res* 35, 237-46.

Taylor, G. (1996). Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr Opin Struct Biol* 6, 830-7.

Tedder, T. F., Tuscano, J., Sato, S., und Kehrl, J. H. (1997). CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 481-504.

van Rinsum, J., van Dijk, W., Hooghwinkel, G. J., und Ferwerda, W. (1984). Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid-forming enzymes. N-acetylneuraminic acid 9-phosphatase and N-acetylneuraminic acid 9-phosphatase. *Biochem J* 223, 323-8.

Varki, A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2, 25-40. *Science* 256, 673-5.

Varki, A. (2001). N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie* 83, 615-22.

Wasley, L. C., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J., Dorner, A. J., Caro, J., Krieger, M., und Kaufman, R. J. (1991). The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood* 77, 2624-32.

Watanabe, S., Kokuho, T., Takahashi, H., Takahashi, M., Kubota, T., und Inumaru, S. (2002). Sialylation of N-glycans on the recombinant proteins expressed by a baculovirus-insect cell system under beta-N-acetylglucosaminidase inhibition. *J Biol Chem* 277, 5090-3.

Weiss, P., Tietze, F., Gahl, W. A., Seppala, R., und Ashwell, G. (1989). Identification of the metabolic defect in sialuria. *J Biol Chem* 264, 17635-6.

Yingnan Zhang, Ashlesha Desphande, Zhihong Xie, RamanathanNatesh, K. Ravi Acharya and Keith Brew (2004). Roles of active sites tryptophans in substrate binding and catalysis by α -1,3 galactosyltransferase. *Glycobiologie* 14, 12095-1302.

ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildung 1: Das Grundgerüst der Sialinsäuren.....	1
Abbildung 2: Grundstruktur eines typischen triantennären, komplexen N-Glycans.	2
Abbildung 3: Das konservierte Tryptophan-204 innerhalb der Proteinsequenz der Epimerase bei verschiedenen Vertretern der Wirbeltiere	13
Abbildung 4: Darstellung der Aminosäuren Tryptophan, Alanin, Isoleucin, Phenylalanin und Histidin in Strukturformeln.	15
Abbildung 5: Position der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp.....	15
Abbildung 6: Prinzip der QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis.	16
Abbildung 7: Der Vektor pFastBac.....	17
Abbildung 8: Agarosegel nach Site-Directed-Mutagenesis.	18
Abbildung 9: Der Vektor pYES2.....	19
Abbildung 10: Restriktionsverdau des pYES2-Plasmids zur Kontrolle der Ligation.....	21
Abbildung 11: Nachweis der cDNAs für die mutierten Gene der UDP-GlcNAc-2- Epimerase/ManNAc-Kinase.....	22
Abbildung 12: Epitop-Mapping von UDP-GlcNAc durch STD-NMR mit Angabe der Beteiligung der Protonen an der Bindung an die Epimerase in % (Blume <i>et al.</i> , 2004).....	25
Abbildung 13: Die Strukturformeln der unnatürlichen Aminosäuren p-Benzoyl-L-phenylalanin (a) und p-Azido-L-phenylalanin (b).	28
Tabelle 1: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase Mutantaen-Klone.....	23

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Reutter für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Möglichkeiten zur Bearbeitung und für sein Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Hinderlich, für seine großartige persönliche Betreuung und seine unermüdliche Geduld bedanken.

Herrn Dr. Markus Berger und Frau Dr. Astrid Blume danke ich für ihre kontinuierliche Unterstützung und Motivation.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der AG Reutter für die Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre jahrelange Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Heinrich Wieland, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [...] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 10.08.2011

Heinrich Wieland