

Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Charité-Universitätsmedizin Berlin-Campus Benjamin Franklin
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Werner Reutter

**Neue Eigenschaften der
UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/
N-Acetylmannosamin-Kinase**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wenke Weidemann
aus Wolmirstedt

Oktober 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

Disputation am 19.12.2006

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Studien zur Funktion der GNE, des Schlüsselenzyms der Biosynthese von Sialinsäuren. Die GNE bzw. Sialinsäuren sind essentiell für den Organismus, da GNE-defiziente (KO-) Mäuse embryonal lethal sind. Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der Aufklärung der Regulation dieses Enzyms über seine verschiedenen oligomeren Zustände und auf der Identifizierung interagierender Proteine. Des Weiteren werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die bezüglich der GNE-defizient sind, isoliert und näher charakterisiert. Mittels Y2H-System wurde die Kinasedomäne der GNE als wichtige Komponente für die Oligomerisierung identifiziert. Außerdem konnten mittels Y2H-Screening gegen eine cDNA-Genbank aus fötalem humanem Hirn vier interagierende Proteine isoliert werden. Diese vier Proteine sind CRMP-1, PLZF, RIF 1 und KIAA 1549. Die Interaktion von CRMP-1 mit GNE konnte durch Co-Immunpräzipitationen bestätigt werden. Ebenso konnte die Interaktion von PLZF mit GNE durch *pull down*-Assays bestätigt werden. Nach der Isolation embryonaler Stammzellen wurden diese zunächst genotypisch mittels PCR und biochemisch mittels Enzym-Assay charakterisiert. Anschließend wurden ihre Stammzellmarker bestimmt, um die Pluripotenz der Zellen sicherzustellen. Des Weiteren wurden WT- und KO-ES-Zellen unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen kultiviert und bezüglich ihrer Sialinsäurekonzentration (Resorcinol-Assay) und Oberflächensialylierung (FACS) miteinander verglichen. Anschließend wurden die KO-ES-Zellen mit dem Sialinsäurevorläufer ManNAc inkubiert, um das Defizit an Sialinsäuren auszugleichen. Dabei wurde herausgefunden, dass eine Konzentration von 1-3 mM ManNAc ausreichend ist, um die Sialylierung der KO-ES-Zellen auf das Niveau der WT-ES-Zellen anzuheben. Die Proliferation der ES-Zellen wurde ebenfalls unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht, wobei kein Unterschied zwischen WT- und KO-ES-Zellen festgestellt werden konnte.

Summary

The available work describes studies for the function of the bifunctional enzyme GNE, the key enzyme of the biosynthesis of sialic acids. The GNE and/or sialic acids are essential for the organism, since GNE deficient (KO-) mice are embryonic lethal. This work focuses on the elucidation of the regulation of this enzyme over its different oligomeric states and on the identification of interacting proteins. Additionally murine embryonic stem cells, which are deficient in GNE were isolated and characterized. Using Y2H system the kinase domain of the GNE was identified as important component for oligomerization. In addition by screening a cDNA gene bank from fetal human brain four interacting proteins were isolated: CRMP1, PLZF, RIF1 and KIAA1549. The interaction of CRMP1 with GNE could be confirmed by coimmunoprecipitation. Likewise the interaction of PLZF with GNE could be verified by pull down assays. After the isolation of murine embryonic stem cells these were characterized first genotypically using PCR and biochemically using radioactive enzyme assay. Subsequently, they were examined for their stem cell markers, in order to guarantee the pluripotency of these cells. WT and KO cells were cultivated under FCS containing and serum-free conditions and were compared concerning their sialic acid content (resorcinol assay) and cell surface sialylation (FACS). Subsequently, KO stem cells were incubated with the sialic acid precursor ManNAc, in order to adjust the deficit at sialic acids. It was found out that a concentration of 1-3 mM ManNAc is sufficient, to raise the sialylation level of WT stem cells. The proliferation of stem cells was examined on different culture conditions, whereby no difference between WT and KO stem cells could be determined.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 3 |
| SUMMARY | 4 |
| 1 EINLEITUNG | 8 |
| 1.1 DIE UDP-N-ACETYLGLUKOSAMIN 2-EPIMERASE/N-ACETYL-MANNOSAMIN-KINASE (GNE)8 | |
| 1.2 EXPRESSIONSMUSTER UND SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DER GNE..... | 10 |
| 1.3 REGULATION DER GNE..... | 11 |
| 1.4 PATHOLOGIE DER GNE..... | 12 |
| 1.4.1 Sialurie..... | 12 |
| 1.4.2 Erbliche Einschlußkörperchenmyopathie (HIBM)..... | 13 |
| 1.5 DIE ENTWICKLUNG DER MAUS UND DIE BEDEUTUNG DER GNE FÜR DIE EMBRYOGENESE.... | 14 |
| 1.6 DIE BIOSYNTHESE VON SIALINSÄUREN UND IHRE STRUKTURVIELFALT..... | 15 |
| 1.7 SIALINSÄUREN UND IHRE BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN..... | 18 |
| 1.7.1 Beeinflussung von Struktur und Funktion von Glycokonjugaten..... | 19 |
| 1.7.2 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion..... | 20 |
| 1.7.3 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene..... | 22 |
| 1.7.4 Antigenmaskierung..... | 22 |
| 1.7.5 Bedeutung der Sialinsäuren für die Entwicklung..... | 23 |
| 1.8 ZIELSETZUNG..... | 26 |
| 2 ERGEBNISSE | 27 |
| 2.1 OLIGOMERISIERUNG DER GNE..... | 27 |
| 2.2 IDENTIFIZIERUNG VON GNE-INTERAGIERENDEN PROTEINEN..... | 30 |
| 2.3 NACHWEIS DER INTERAKTION MITTELS IMMUNCHEMISCHER METHODEN..... | 32 |
| 2.3.1 Spezifität des Anti-GNE-Antikörpers..... | 32 |
| 2.3.2 Überprüfung der Interaktion von GNE mit CRMP1 mittels Co-Immunpräzipitation..... | 33 |
| 2.3.3 Überprüfung der Interaktion von GNE und PLZF mittels Co-Immunpräzipitation und GST-pull down..... | 34 |
| 2.3.4 Studien zu posttranslationalen Modifikationen der GNE..... | 35 |
| 2.4 ISOLIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN..... | 37 |
| 2.4.1 Pluripotenz der ES-Zellen..... | 39 |
| 2.5 CHARAKTERISIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN..... | 41 |
| 2.5.1 UDP-GlcNAc 2-Epimerase-Aktivität..... | 41 |
| 2.5.2 Vergleich der Gesamtsialylierung von WT- und KO-ES-Zellen mittels Periodat-Resorcinol-Assay..... | 42 |
| 2.5.3 Supplementierung der KO-ES-Zellen mit N-Acetylmannosamin..... | 44 |
| 2.5.4 Analyse der Oberflächensialylierung mittels FACS..... | 45 |
| 2.5.5 Proliferation von WT und KO ES-Zellen..... | 47 |
| 3 DISKUSSION | 50 |
| 3.1 OLIGOMERISIERUNG DER GNE..... | 50 |
| 3.2 IDENTIFIZIERUNG VON BINDUNGSPARTNERN DER GNE..... | 52 |
| 3.2.1 Der Interaktionspartner CRMP1..... | 54 |
| 3.2.2 Der Interaktionspartner PLZF..... | 57 |
| 3.3 ISOLIERUNG MURINER ES ZELLEN..... | 60 |
| 3.4 CHARAKTERISIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN..... | 62 |
| 4 ARBEITSHYPOTHESE UND AUSBLICK | 67 |
| 5 MATERIAL UND METHODEN | 70 |
| 5.1 MATERIAL..... | 70 |
| 5.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien..... | 70 |
| 5.1.2 Organismen..... | 70 |
| 5.1.2.1 Prokaryotische Organismen..... | 70 |
| 5.1.2.2 Eukaryotische Organismen..... | 70 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 5.1.2.2.1 | Insektenzellen Sf9/Sf900 (GibcoBRL, USA) | 70 |
| 5.1.2.2.2 | PC12- Zellen (ATCC, Rockville, USA) | 71 |
| 5.1.2.2.3 | HL60-Zellen (Kepler et al. 1999) | 71 |
| 5.1.2.2.4 | Embryonale Stammzellen | 71 |
| 5.1.3 | <i>Tiere</i> | 72 |
| 5.1.3.1 | C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, USA)..... | 72 |
| 5.1.4 | <i>Vektoren</i> | 72 |
| 5.1.4.1 | Klonierungsvektor..... | 72 |
| 5.1.4.1.1 | pCR®-Blunt (Invitrogen, USA)..... | 72 |
| 5.1.4.2 | Vektoren für das Yeast Two Hybrid-System | 73 |
| 5.1.4.2.1 | pBTM117c (9350 bp) | 73 |
| 5.1.4.2.2 | pGAD427 (9134 bp) | 74 |
| 5.1.4.3 | Expressionsvektor für Säugerzellen | 74 |
| 5.1.4.3.1 | pcDNA 3.1/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, USA)..... | 74 |
| 5.1.4.4 | Expressionsvektor für Insektenzellen..... | 75 |
| 5.1.4.4.1 | pFASTBAC™ 1 (Invitrogen, Niederlande) | 75 |
| 5.1.5 | <i>Oligonukleotide (MWG Biotech, München)</i> | 76 |
| 5.1.5.1 | Amplifizierung der GNE und deren Fragmente | 76 |
| 5.1.5.2 | Für die Sequenzierung der GNE und deren Fragmente..... | 77 |
| 5.1.5.2.1 | Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im pCR®Blunt Vektor | 77 |
| 5.1.5.2.2 | Markierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor..... | 78 |
| 5.1.5.2.3 | Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor..... | 78 |
| 5.1.5.3 | Primer für die Charakterisierung der ES-Zellen..... | 78 |
| 5.1.6 | <i>Enzyme</i> | 78 |
| 5.1.7 | <i>Antikörper</i> | 79 |
| 5.1.8 | <i>Lectine</i> | 80 |
| 5.1.9 | <i>Inhibitoren</i> | 81 |
| 5.1.10 | <i>Medien</i> | 81 |
| 5.1.11 | <i>Medienzusätze</i> | 81 |
| 5.1.11.1 | Antibiotika | 81 |
| 5.1.11.2 | Seren | 82 |
| 5.1.12 | <i>Bestandteile der exterazellulären Matrix</i> | 82 |
| 5.1.13 | <i>Wachstumsfaktoren</i> | 82 |
| 5.1.14 | <i>Kits</i> | 82 |
| 5.1.15 | <i>Größenmarker</i> | 82 |
| 5.1.16 | <i>Membranen</i> | 83 |
| 5.1.17 | <i>Agarosen und Sepharosen</i> | 83 |
| 5.1.18 | <i>Materialien und Substanzen für radioaktiven Enzymassay</i> | 83 |
| 5.1.19 | <i>Geräte</i> | 83 |
| 5.2 | METHODEN | 85 |
| 5.2.1 | <i>Behandlung von Lösungen und Geräten</i> | 85 |
| 5.2.2 | <i>Molekularbiologische Methoden</i> | 85 |
| 5.2.2.1 | DNA-Grundtechniken | 85 |
| 5.2.2.1.1 | Plasmidisolierung aus Bakterien..... | 85 |
| 5.2.2.1.1.1 | Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly 1979) | 85 |
| 5.2.2.1.1.2 | Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA | 87 |
| 5.2.2.1.2 | Anreichern der DNA-Proben durch DNA-Fällung | 87 |
| 5.2.2.1.3 | Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA | 88 |
| 5.2.2.1.4 | Trennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese..... | 88 |
| 5.2.2.1.5 | Isolierung von DNA mittels Gelelektion | 89 |
| 5.2.2.1.6 | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) nach (Saiki 1986, Mullis und Faloona 1986). | 90 |
| 5.2.2.1.7 | Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Brooks, 1987; Smith und Wilcox, 1970) | 92 |
| 5.2.2.1.8 | Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss et al. 1968, Richardson et al. 1968)..... | 93 |
| 5.2.2.2 | DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977 und Sanger und Coulson 1975) | 94 |
| 5.2.2.3 | RNA-Grundtechniken | 96 |
| 5.2.2.3.1 | Chromatographische Isolierung von Gesamt-RNA | 96 |
| 5.2.2.3.2 | Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA..... | 96 |
| 5.2.2.3.3 | Auftrennung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese..... | 96 |
| 5.2.2.4 | RT-PCR | 97 |
| 5.2.3 | <i>Zellbiologische Methoden</i> | 98 |
| 5.2.3.1 | Zellbiologische Methoden für Säugerzellen..... | 98 |
| 5.2.3.1.1 | Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen..... | 98 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.2.3.1.2 | Kultivierung von Säugerzellen | 98 |
| 5.2.3.1.3 | Allgemeines zur Kultivierung embryonaler Stammzellen von Mäusen | 99 |
| 5.2.3.1.4 | Kultivierung von ES-Zellen | 100 |
| 5.2.3.1.5 | Generierung embryonaler Stammzellen von Mäusen | 101 |
| 5.2.3.1.6 | Isolierung, Kultivierung und Inaktivierung von Feederzellen..... | 101 |
| 5.2.3.1.7 | Konservierung von Säugerzellen | 102 |
| 5.2.3.1.8 | Transfektion von Säugerzellen mit DNA..... | 103 |
| 5.2.3.1.9 | Inhibition des Proteasoms in Säugerzellen | 103 |
| 5.2.3.1.10 | Auslösen oxidativen Stress in Säugerzellen..... | 104 |
| 5.2.3.1.11 | Durchflußcytometrie/FACS (fluorescence-activated cell scanning)..... | 104 |
| 5.2.3.1.12 | Alkalische Phosphatase Assay | 105 |
| 5.2.3.1.13 | Proliferationsassay | 105 |
| 5.2.3.2 | Zellbiologische Methoden für Insektenzellen | 106 |
| 5.2.3.2.1 | Kultivierung von Insektenzellen | 106 |
| 5.2.3.2.2 | Konservierung von Insektenzellen..... | 107 |
| 5.2.3.2.3 | Überexpression rekombinanter Proteine in Insektenzellen mit dem Baculovirus-System 107 | 107 |
| 5.2.3.3 | Mikrobiologische Methoden für Bakterienzellen..... | 108 |
| 5.2.3.3.1 | Kultivierung von E. coli..... | 108 |
| 5.2.3.3.2 | Konservierung von Bakterien | 109 |
| 5.2.3.3.3 | Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)..... | 109 |
| 5.2.4 | <i>Identifizierung interagierender Proteine mittels des Yeast Two Hybrid-Systems.....</i> | <i>109</i> |
| 5.2.5 | <i>Biochemische Methoden</i> | <i>110</i> |
| 5.2.5.1 | Aufarbeitung von Säugerzelllysaten | 110 |
| 5.2.5.2 | Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)..... | 111 |
| 5.2.5.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)..... | 111 |
| 5.2.5.4 | Coomassie-Blau-Färbung..... | 113 |
| 5.2.5.5 | Elektrotransfer von Proteinen (Towbin 1979, Burnette 1981) | 114 |
| 5.2.5.6 | Immunochemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer | 115 |
| 5.2.5.6.1 | Detektion von Meerrettich-Peroxidase (POD)..... | 115 |
| 5.2.5.7 | Reinigung überexprimierter poly-Histidin-markierter Fusionsproteine | 116 |
| 5.2.5.8 | Umpuffern von Proteinlösung mittels Gelfiltration..... | 117 |
| 5.2.5.9 | Kopplung von gereinigtem Protein an CNBr-aktivierte Sepharose..... | 117 |
| 5.2.5.10 | Aufreinigung von Anti-GNE-Antikörper aus Kanninchenserum mittels Immunaффinitätschromatographie | 118 |
| 5.2.5.11 | Immunpräzipitation | 118 |
| 5.2.5.12 | GST-pull down-Assay | 119 |
| 5.2.5.13 | GNE-Aktivitätsassay (Zeitler 1992)..... | 120 |
| 5.2.5.14 | Resorcinol-Assay zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts (Jourdain et al. 1971) | 120 |
| 6 | LITERATUR..... | 122 |
| 7 | ANHANG..... | 138 |
| 7.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 138 |
| 7.2 | VERÖFFENTLICHUNGEN | 142 |
| 7.2.1 | <i>Publikationen.....</i> | <i>142</i> |
| 7.2.2 | <i>Posterbeiträge</i> | <i>143</i> |
| 7.3 | DANKSAGUNG..... | 145 |