

Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Abteilung Biochemie
Fachbereich Humanmedizin
Abteilungsleiter: Prof. Dr. W. Reutter

**Expression und funktionelle Charakterisierung des
Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese,
UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase**

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Astrid Blume
aus Hamburg

2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin und der Fakultät für Chemie der Universität Konstanz unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Reutter und Prof. Dr. R.R. Schmidt durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R.R. Schmidt, Universität Konstanz, Fakultät für Chemie
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Hengge-Aronis, Freie Universität Berlin, Institut für Biologie

Tag der Disputation: 23.05.2003

Inhalt

INHALT	3
ABBILDUNGEN & TABELLEN	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	11
1.1 Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren	11
1.1.1 Struktur von Sialinsäuren	11
1.1.2 Vorkommen von Sialinsäuren	12
1.1.3 Sialylierte Oligosaccharidstrukturen auf Proteinen und Lipiden.....	13
1.2 Biologische Funktion von Sialinsäuren	15
1.2.1 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion	15
1.2.2 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene	16
1.2.3 Sialinsäuren maskieren antigene Determinanten	17
1.2.4 Sialinsäuren beeinflussen die Struktur und Funktion von Glycokonjugaten	18
1.2.5 Sialinsäuren und Carcinome	18
1.3 Biosynthese von Sialinsäuren	19
1.3.1 Biosynthese von UDP-GlcNAc	20
1.3.2 Biosynthese von CMP-Neu5Ac	22
1.3.3 Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten.....	24
1.4 Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	24
1.5 Zielsetzung der Arbeit	28
2. EXPERIMENTELLER TEIL	31
2.1. Materialien	31
2.1.1 Vektoren.....	31
2.1.2 Bakterienstämme	31
2.1.3 Hefestämme	31
2.1.4 Insektenzellen	31
2.1.5 Medien und Kultivierung der Zellen	31
2.1.5.1 Bakterien.....	32
2.1.5.2 Hefen.....	32
2.1.5.3 Insektenzellen.....	34
2.1.5.4 CHO-Zellen	35
2.1.6 Primer.....	35
2.1.7 Chemikalien	35
2.1.8 Geräte	36
2.2. Methoden	36
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	36
2.2.1.2 Reinigung von DNA	37
2.2.1.3 Fällung von DNA	37
2.2.1.4 Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	38
2.2.1.5 DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen	38
2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution	39
2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA.....	40
2.2.1.10 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	40
2.2.1.11 Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i>	40
2.2.1.12 Sequenzierungen	41
2.2.1.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41
2.2.1.14 Herstellung von Punktmutanten	42
2.2.2 Expression von rekombinantem Protein in <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.2.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen.....	42

2.2.2.2	Expression von rekombinantem Protein in <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.3	Expression von rekombinantem Protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.2.3.1	Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Hefezellen.....	44
2.2.3.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.2.3.3	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen	45
2.2.3.4	Expression von rekombinantem Protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.2.4	Expression von rekombinantem Protein in <i>Pichia pastoris</i>	46
2.2.4.1	Herstellung kompetenter <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	46
2.2.4.2	Linearisieren der Plasmid-DNA	46
2.2.4.3	Elektroporation von <i>Pichia pastoris</i> -Hefezellen	46
2.2.4.4	Ermittlung des Mut-Phänotyps	47
2.2.4.5	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen	47
2.2.4.6	Lyse von Hefezellen.....	48
2.2.4.7	Expression von rekombinantem Protein in <i>Pichia pastoris</i>	48
2.2.5	Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen.....	49
2.2.5.1	Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA	49
2.2.5.2	Analyse der Bacmid-DNA	50
2.2.5.3	Herstellung von rekombinantem Virus	50
2.2.5.4	Analyse der Viren.....	51
2.2.5.5	Amplifikation von Virus	51
2.2.5.6	Bestimmung des Virus-Titers	52
2.2.5.7	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen	52
2.2.5.8	Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen.....	53
2.2.6	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	54
2.2.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford	54
2.2.6.2	Konzentrieren von Proben	54
2.2.6.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
2.2.6.4	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	56
2.2.6.5	Silberfärbung von Proteingelen	56
2.2.6.6	Western-Blot.....	56
2.2.6.7	Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen.....	57
2.2.6.8	UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays	57
2.2.6.9	ManNAc-Kinase-Assays.....	58
2.2.6.10	UDP-Gal-4-Epimerase-Assay.....	59
2.2.6.11	β -Gal-Assay	60
2.2.6.12	Testen verschiedener inhibitorischer Strukturen.....	60
2.2.6.13	Bestimmung der oligomeren Strukturen	60
2.2.7	Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	61
2.2.7.1	Glutathion-Affinitätschromatographie	61
2.2.7.2	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	62
2.2.7.3	Salminsulfatpräzipitation	62
2.2.7.4	MonoQ-Chromatographie	63
2.2.7.5	Hydroxyapatit-Chromatographie	63
2.2.7.6	ATP-Agarose-Chromatographie	64
2.2.7.7	Blue- und Red-Sepharose-Chromatographie	64
2.2.7.8	Phenylsepharose-Chromatographie	64
2.2.7.9	Gelfiltration	65
2.2.7.10	Analyse der erhaltenen Fraktionen	65
2.2.8	Chemische Synthese von UDP-GlcNAc-Derivaten	65
2.2.8.1	Synthese von oxidiertem UDP-GlcNAc.....	66
2.2.8.2	Synthese von oxidiertem Uridin	66
2.2.8.3	Synthese von oxidiertem Methylribosid.....	67
2.2.8.4	Synthese von reduziertem o-UDP-GlcNAc	67
2.2.9	NMR-Untersuchungen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.....	68
2.2.9.1	Proteinreinigung für NMR-Untersuchungen.....	68
2.2.9.1	STD-NMR-Messungen	69
3.	ERGEBNISSE.....	71
3.1	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in <i>Escherichia coli</i>	71
3.1.1	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit GST-Tag	71
3.1.2	Reinigung und Charakterisierung der GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	73
3.1.3	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit His-Tag	74
3.1.4	Reinigung und Charakterisierung der His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	75
3.1.5	Versuche zum Auflösen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate	76
3.2	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Hefe.....	77

3.2.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
3.2.2 Methanol induzierte Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in <i>Pichia pastoris</i>	79
3.2.3 Konstitutive Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in <i>Pichia pastoris</i>	86
3.3 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Insektenzellen	91
3.3.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mit dem BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystem	92
3.3.2 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	96
3.3.3 Reinigung der His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	102
3.3.4 Auflösen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate	103
3.4 Generierung und Charakterisierung von Deletionsmutanten	106
3.4.1 Generierung der Deletionsmutanten	107
3.4.2 Enzymatische Aktivitäten der Deletionsmutanten	113
3.4.3 Oligomerer Zustand der Deletionsmutanten.....	115
3.4.4 Hemmung der Deletionsmutanten durch CMP-Neu5Ac	118
3.5 Synthese und biochemische Charakterisierung von UDP-GlcNAc-Derivaten als mögliche Enzyminhibitoren.....	119
3.5.1 Synthese von oxidierten UDP-GlcNAc Derivaten	120
3.5.2 Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc	121
3.5.3 Charakterisierung der Hemmung der Epimeraseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc Derivate	122
3.5.4 Charakterisierung der Hemmung der Kinaseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc und seine Derivate	124
3.5.5 Hemmung der UDP-Gal-4-Epimerase durch o-UDP-GlcNAc und o-UDP	126
3.5.6 Crosslinking der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc	127
3.5.7 Wirkung von o-UDP auf CHO-Zellen.....	129
3.6 Biochemische Charakterisierung von weiteren potentiellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Inhibitoren	131
3.6.1 Derivate des UDP-GlcNAc als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	131
3.6.2 Derivate des 2-Acetamidoglucals als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase...135	135
3.6.3 Analoga des Übergangszustandes als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ..136	136
3.6.4 Derivate der CMP-Neu5Ac als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	137
3.6.5 UMP-Derivate als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	139
3.6.6 Nikkomycin Z als möglicher Inhibitor der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	140
3.6.7 Konzentrationsabhängige Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch ausgewählte Inhibitoren	141
3.7 NMR-Untersuchungen zur Ligandenbindung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ..143	143
3.7.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	143
3.7.2 Das STD-Experiment	144
3.7.3 NMR-Untersuchungen mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase	146
3.7.4 NMR-Untersuchungen mit der ManNAc-Kinase.....	149
4. DISKUSSION	155
4.1. Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	155
4.2 Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ ManNAc-Kinase	158
4.3 Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate	162
4.4 Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch weitere Inhibitoren	164
4.5 NMR-Untersuchungen zur Ligandenbindung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ..166	166
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	169
5.1 Synopsis	171
6. LITERATURVERZEICHNIS	173
7. ANHANG	187
LEBENS LAUF	191

Inhalt

EIGENE PUBLIKATIONEN	192
DANKSAGUNG	193

Abbildungen & Tabellen

Abbildung 1.1: Struktur von Sialinsäuren.....	12
Abbildung 1.2: Grundstruktur eines typischen triantennären, komplexen N-Glycans.....	14
Abbildung 1.3: Aminozuckerstoffwechsel in Säugetierzellen.....	21
Abbildung 1.4: Sialinsäurebiosynthese in Säugetierzellen.....	23
Abbildung 1.5: Postulierte enzymatische Reaktion der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Säugetieren.....	27
Abbildung 2.1: Pulssequenz für STD-NMR-Experimente.....	69
Abbildung 3.1: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen nach der Glutathion-Sephadex-Säule.....	73
Abbildung 3.2: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen nach der Ni-NTA-Agarose-Säule.....	76
Abbildung 3.3: Homologe Rekombination zwischen dem pPICZ/2epi-Vektor und dem Pichia pastoris-Genom.....	81
Abbildung 3.4: Mit dem Methanol-induzierbaren pPICZ-System in Pichia pastoris überexprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.....	82
Abbildung 3.5: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Zeit der Methanol-Induktion.....	84
Tabelle 3.1: Lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand in µg pro Liter Hefekultur.....	85
Abbildung 3.6: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten im proteinhaltigen Überstand und im resuspendierten Pellet.....	89
Tabelle 3.2: Lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand in µg pro Liter Hefekultur.....	90
Abbildung 3.7: Herstellung von rekombinantem Baculovirus und Genexpression mit dem BAC-TO-BAC-Expression-System.....	93
Abbildung 3.8: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von Sf9-, Sf-900 II- und High Five-Zellen nach Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus.....	94
Abbildung 3.9: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nach unterschiedlich langer Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus.....	95
Abbildung 3.10: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nach Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei verschiedenen MOI.....	95
Abbildung 3.11: Einfluß verschiedener Substanzen und der Temperatur auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität.....	97
Abbildung 3.12: Verschiedene Säulenkombinationen, die im Rahmen dieser Arbeit für die Reinigung der in Insektenzellen exprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase verwendet wurden.....	100
Abbildung 3.13: Silber gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der Fraktionen nach einer MonoQ-, einer Superdex®200- und einer ATP-Agarose-Säule.....	101
Abbildung 3.14: Silber gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der Fraktionen nach einer Phenylsepharose-, einer MonoQ- und einer Superdex®200-Säule.....	102
Tabelle 3.3: Tabellarische Übersicht getesteter Reagenzien, um die aggregierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine in Lösung zu bringen.....	106
Abbildung 3.15: Prinzip der QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis.....	108
Abbildung 3.16: Resultierende Proteine der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA.....	109
Abbildung 3.17: Resultierende Proteine der deletierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA.....	110
Abbildung 3.18: 1%iges Agarose-Gel nach der PCR von rekombinanter Baculovirus-DNA.....	111
Abbildung 3.19: Western-Blot der in Insektenzellen exprimierten Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.....	111
Abbildung 3.20: Relative spezifische Enzymaktivitäten der Deletionsmutanten.....	114
Abbildung 3.21: Ermittlung der oligomeren Zustände der N-terminalen Deletionsmutanten und des Wildtyps.....	116
Abbildung 3.22: Ermittlung der oligomeren Zustände der C-terminalen Deletionsmutanten.....	117
Abbildung 3.23: Relative UDP-GlcNAc-Epimerase-Aktivitäten des Wildtyps und der Δ717-722-, Δ697-722- und Δ490-722-Deletionsmutanten bei Zugabe von verschiedenen CMP-Neu5Ac Konzentrationen.....	119

Abbildung 3.24: Struktur und Synthese von oxidiertem UDP-GlcNAc (<i>o</i> -UDP-GlcNAc) und anschließende Reduktion zu <i>r</i> -UDP-GlcNAc.....	121
Abbildung 3.25: Konzentrationsabhängige und zeitabhängige Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate.....	123
Abbildung 3.26: Konzentrationsabhängige und zeitabhängige Hemmung der ManNAc-Kinase-Aktivität durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate.	125
Abbildung 3.27: Inhibierung der Epimeraseaktivität der UDP-Gal-4-Epimerase und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch <i>o</i> -UDP und <i>o</i> -UDP-GlcNAc in Abhängigkeit von der Konzentration.....	126
Abbildung 3.28: Western-Blot der Crosslink-Kinetik von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch <i>o</i> -UDP-GlcNAc.	128
Abbildung 3.29: Struktur und inhibitorische Wirkung von UDP-GlcNAc-Derivaten.	133
Abbildung 3.30: Struktur und inhibitorische Wirkung von 2-Acetamidoglucal-Derivaten.....	136
Abbildung 3.31: Struktur und inhibitorische Wirkung von Analoga des Übergangszustandes.	137
Abbildung 3.32: Struktur und inhibitorische Wirkung von CMP-Neu5Ac-Derivaten.	138
Abbildung 3.33: Struktur und inhibitorische Wirkung von UMP-Derivaten.	140
Abbildung 3.34: Struktur und inhibitorische Wirkung von Nikkomycin Z.	141
Abbildung 3.35: Relative restliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten bei Inkubation mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.....	142
Abbildung 3.36: Energieübertragung im STD-Experiment von einem gesättigten Protein auf einen Liganden mit zunehmender Zeit.	145
Abbildung 3.37: Bindungsepitop von UDP-GlcNAc.....	146
Abbildung 3.38: Bindungsepitope von GlcNAc und GlcNAc-1-Phosphat.	147
Abbildung 3.39: Bindungsepitop von CMP-Neu5Ac.....	149
Abbildung 3.40: Bindungsepitope für CMP und UMP	149
Abbildung 3.41: Bindungsepitope von ATP, ADP, ManNAc und ManNAc-6-Phosphat.....	150
Abbildung 3.42: Referenz- und STD-Spektrum von ManNAc mit der ManNAc-Kinase.....	151
Abbildung 3.43: Bindungsepitope von ManNAc, ManNProp, ManNBut und GlcNAc.....	152
Abbildung 7.1: ¹ H-NMR (400 MHz, D ₂ O) Spektrum von oxidiertem UDP-GlcNAc.....	187
Abbildung 7.2: ³¹ P-NMR (162 MHz, D ₂ O) Spektrum von oxidiertem UDP-GlcNAc.....	187
Abbildung 7.3: ¹ H-NMR (270 MHz, D ₂ O) Spektrum von oxidiertem Uridin.....	188
Abbildung 7.4: ¹ H-NMR (270 MHz, D ₂ O) Spektrum von oxidiertem Methylribosid.....	188
Abbildung 7.5: ¹ H-NMR (270 MHz, D ₂ O) Spektrum von reduziertem <i>o</i> -UDP-GlcNAc.....	189
Abbildung 7.6: ³¹ P-NMR (243 MHz, D ₂ O) Spektrum von reduziertem <i>o</i> -UDP-GlcNAc.....	189

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
bp	Basenpaare
But	Butyl
CHAPS	3((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propansulfat
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylfuran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Lt	Lactoyl
LB	Lauria Bertani
M	Molar; bei Massenspektren: Molekülion
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/-ionisierung
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
Me	Methyl
MOI	Multiplicity of infection
MS	Massenspektrometrie
m/z	Massenzahl (Masse pro Ladung)
NCAM	Neural-Cell-Adhesion-Molecule
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear-Overhauser-Effekt
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>ortho</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pyrophosphat
ppm	parts per million
Prop	Propyl
PSA	Polysialic acid
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Sia	Sialinsäure
STD	Sättigungstransfer-Differenz
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit

Lebenslauf

Astrid Blume, geboren am 15.01.1974 in Bad Oldesloe

SCHULBILDUNG

1980 – 1984	Grundschule Hinschenfelde, Hamburg
1984 – 1993	Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg
1993	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

1993 – 1999	Biologiestudium an der Universität Hamburg
1996	Vordiplomsprüfung Biologie
1998	Diplomhauptprüfung Biologie
1998 – 1999	Diplomarbeit im Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. U. Wienand und Prof. Dr. E. Heinz mit dem Thema „Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Desaturierung langkettiger Sphingobasen“
ab 1999	Anfertigung der Dissertation

BERUFLICHER WERDEGANG

1999 – 2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.R. Schmidt, Universität Konstanz
2000 – 2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Reutter, Freie Universität Berlin

Eigene Publikationen

Originalpublikationen:

BLUME, A., CHEN, H., REUTTER, W., SCHMIDT, R. R. UND HINDERLICH, S. (2002) 2',3'-Dialdehydo-UDP-*N*-acetylglucosamine inhibits UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase, the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *FEBS Lett.* **521**, 127-132

CHEN, H., BLUME, A., ZIMMERMANN-KORDMANN, M., REUTTER, W. UND HINDERLICH, S. (2002) Purification and characterization of *N*-acetylneuraminic acid-9-phosphate synthase from rat liver. *Glycobiology* **12**, 65-71

HINDERLICH, S., BERGER, M., BLUME, A., CHEN, H., GHADERI, D. UND BAUER, C. (2002) Identification of human L-fucose kinase amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 650-654

Kurzartikel:

BLUME, A., EFFERTZ, K., REUTTER, W. UND HINDERLICH, S. (2001) Domain structure of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase. *Glycoconj. J.* **18**, 148

BLUME, A., EFFERTZ, K., REUTTER, W. UND HINDERLICH, S. (2001) Domain structure of UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *Jahrbuch des Fachbereichs Humanmedizin des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin*

CHEN, H., BLUME, A., ZIMMERMANN-KORDMANN, M., REUTTER, W. UND HINDERLICH, W. (2001) Purification and characterization of *N*-acetylneuraminic acid-9-phosphate synthase from rat liver. *Jahrbuch des Fachbereichs Humanmedizin des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin*

BLUME, A., GHADERI, D., SCHMIDT, R. R., REUTTER, W. UND HINDERLICH, S. (2002) A potent inhibitor of UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase, the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *Jahrbuch des Fachbereichs Humanmedizin des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin*

BLUME, A., CHEN, H., REUTTER, W., SCHMIDT, R. R. UND HINDERLICH, S. (2002) Uridine-5'-Diphospho-2', 3'-dialdehyde- α -D-*N*-acetylglucosamine inhibits UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase, the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *XXIst International Carbohydrate Symposium, Cairns, Australien*

Vortrag:

Domain structure of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase.
XVI International Symposium on Glycoconjugates, Den Haag, Niederlande (2001)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Reutter und Herrn Prof. Dr. R. R. Schmidt danke ich für ihr ständiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie ihr Vertrauen und die großzügige und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Donner (Schering AG, Berlin) sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, die Unterstützung beim Erlernen der Insektenzellkultur und die vielen anregenden Diskussionen. Besonders genannt seien hier Frau M. Isernhagen und Frau B. Ockert.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Peters (Universität zu Lübeck) möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Ein besonderer Dank geht an Dr. A. J. Benie, der mich in die Geheimnisse der STD-NMR-Spektroskopie eingeweiht hat und mir bei Computerproblemen stets eine große Hilfe war.

Dr. Stephan Hinderlich danke ich für eine gute und effektive Zusammenarbeit, sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. R. Schmidt danke ich für die vielen aufschlußreichen Diskussionen. Besonders genannt seien hier Dr. K.-H. Jung und Florian Stolz.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für das nette und entspannte Arbeitsklima bedanken. Insbesondere Darius Ghaderi, Esther Ragge, Lars Mantey, Dr. Markus Berger und Dr. Martina Schwarzkopf sei für die hilfreiche Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte gedankt. Viola Liebich und vielen anderen danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, mit der sie den Erfolg dieser Arbeit wesentlich gefördert haben.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und hervorragende Unterstützung während einer nicht immer ganz leichten Zeit.