

3. Ergebnisse

Für biochemische Untersuchungen, wie das Studium von Substrat-Protein-Wechselwirkungen, das Testen potentieller inhibitorischer Substanzen, aber auch für die Kristallisation muß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als gereinigtes Enzym in größeren Mengen vorliegen.

3.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *Escherichia coli*

Bisher war es zwar gelungen, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *E. coli* zu exprimieren, jedoch konnte nur inaktives Protein nachgewiesen werden (Effertz, 1999). Vermutlich lagern die Bakterienzellen das überexprimierte Protein in sogenannten Inclusion-Bodies ein. Trotzdem wurde zunächst nochmals versucht, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in dem einfachen prokaryontischen Expressionssystem *E. coli* zu exprimieren, diesmal jedoch statt mit einem His-Tag mit einem anderen Tag.

3.1.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit GST-Tag

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein Protein, welches häufig zu einer erhöhten Löslichkeit von Proteinen führt, die in *E. coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert werden. Deshalb wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als GST-Fusionsprotein exprimiert, so daß ein GST-Tag N-terminal an das Enzym gebunden wird. Dafür wurde die kodierende Sequenz der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Ratte aus dem pYES2/2epi-Vektor über die Restriktionsenzyme *Xho* I und *Not* I in den pGEX-4T-3-Vektor umklontiert. 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 ansequenziert. Anschließend wurde das Plasmid in BL21 StarTM(DE3) pLysS *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion der transgenen Bakterien erfolgte durch die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol im Medium.

In der Literatur sind zahlreiche Proteine beschrieben, die in Bakterien nur als Inclusion-Bodies exprimiert werden können (Georgiou und Valax, 1996; Makrides, 1996). In einigen Fällen ist es gelungen, gewisse Anteile der Proteine in Lösung zu bringen, indem die Bakterien statt bei 37 °C bei niedrigeren Temperaturen kultiviert wurden.

Auch die Induktion der Proteinbiosynthese mittels niedrigeren IPTG-Konzentrationen hatte in einigen Fällen einen positiven Einfluß auf die Proteinlöslichkeit. Die Bakterien exprimieren dann weniger Protein bzw. exprimieren das Protein langsamer, wodurch die Neigung zur Bildung von Aggregaten zum Teil reduziert wird. Deshalb wurden die BL21-Zellen mit dem pGEX-4T/2epi-Vektor zunächst bei 18 °C, 24 °C und bei 37 °C kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 wurde mit 0,01 mM IPTG, 0,03 mM IPTG oder 0,1 mM IPTG induziert, so daß das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen abgelesen werden konnte. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 6 und 20 h nach der IPTG-Induktion wurden Aliquots aus den Kulturen abgenommen. Nach Aufschluß der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation wurden der proteinhaltige Überstand und das resuspendierte Pellet auf Enzymaktivitäten untersucht und die Anwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in einem SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen.

Mittels SDS-PAGE konnte in allen Fällen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Überstand detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig konnte sowohl Epimerase- als auch Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase entgegen früheren Experimenten durchaus als aktives Protein in Bakterien exprimiert werden kann. Aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten kann die Menge an aktivem überexprimiertem Enzym im proteinhaltigen Überstand ermittelt werden. Die transgenen Bakterien exprimieren zwischen 1 und 2 mg aktive lösliche GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Bakterienkultur. Zahlreiche andere GST-Fusionsproteine werden mit Ausbeuten von 15 mg/l aus Bakterien isoliert (Smith und Johnson, 1988). Die erzielte Expression von etwa 1,5 mg/l liegt damit um den Faktor zehn niedriger als die Werte für andere Proteine.

Auch in den resuspendierten Pellets wurde epimerase- und kinaseaktives Protein nachgewiesen. Im Vergleich zu den proteinhaltigen Überständen waren die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Mengen jedoch geringer und die Aktivitäten stark reduziert. Wird jeweils die gemessene Enzymaktivität auf die aus einem SDS-Gel abgeschätzte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Menge bezogen, d.h. die spezifische Enzymaktivität ermittelt, so wird deutlich, daß sich im Pellet ein erheblicher Anteil inaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase befindet, da die spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität der Pellets wesentlich geringer ist als die der proteinhaltigen Überstände.

Der Anteil löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in den proteinhaltigen Überständen variiert mit der IPTG-Inkubationszeit. Bakterien, die bei 37 °C kultiviert wurden, exprimierten etwa 3 h nach der IPTG-Induktion die meiste UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, Bakterien, die bei 18 °C kultiviert wurden, erst nach

9-13 h (Daten nicht gezeigt). Ein Unterschied in der maximalen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Ausbeute zwischen den Bakterien, die bei 18 °C, und denen, die bei 24 °C bzw. 37 °C kultiviert wurden, konnte nicht beobachtet werden. Auch die für die Induktion verwendeten IPTG-Konzentrationen hatten keinen Einfluß auf den Anteil löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Überstand. Deshalb wurde die Proteinexpression in den folgenden Versuchen mit 0,03 mM IPTG induziert und die Bakterien für 9-13 h bei 18 °C bzw. 3 h bei 37 °C kultiviert.

3.1.2 Reinigung und Charakterisierung der GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde als Fusionsprotein mit einem GST-Tag exprimiert. Dieser kann bei der Proteinreinigung für eine effektive Affinitätschromatographie über eine Glutathion-Sepharose-Säule genutzt werden. Die lösliche GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bindet an diese Matrix und läßt sich anschließend mit 10 mM Glutathion eluieren. So läßt sich eine zu 95% reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isolieren (Abb. 3.1).

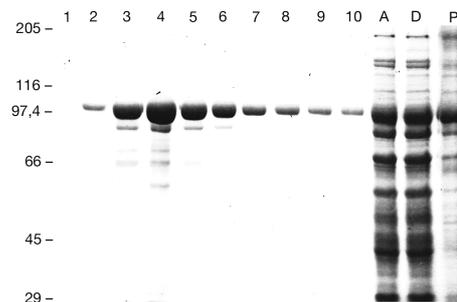


Abbildung 3.1: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen nach der Glutathion-Sepharose-Säule.

300 ml Bakterien wurden bei 18 °C für 12 h mit 0,03 mM IPTG induziert. Nach Aufschluß der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation wird der proteinhaltige Überstand auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Die gebundene GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (109 kDa) wird mit 10 mM Glutathion eluiert und je 5 µl der eluierten Fraktionen auf einem SDS-Gel analysiert. (1-10 - Fraktionen nach der Glutathion-Sepharose-Säule, A – Auftrag, D – Durchlauf, P - resuspendiertes Pellet)

Die so gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde anschließend über die Superdex®200-Säule gegeben, um die Größe, d.h. den oligomeren Zustand des Proteins zu bestimmen. Dabei zeigte sich, daß die aus dem proteinhaltigen Überstand gereinigte GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase fast ausschließlich aus epimerase- und kinaseaktiven Komplexen ≥ 2 MDa besteht. Diese Aggregate sind wesentlich größer als die erwarteten Hexamere. Lediglich Spuren hexamerer GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnten nachgewiesen werden.

Diese hexamere GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zeigte eine wesentlich höhere spezifische Aktivität als die GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate. Daraus läßt sich schließen, daß die GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate zwar Epimerase- und Kinaseaktivität zeigen, jedoch noch sehr viel mehr GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase enthalten, die im Aktivitätstest nicht reagiert. Dies kann zum einen daran liegen, daß die Aggregate größere Mengen an inaktivem Protein enthalten, oder zum anderen daran, daß weiter im Innern liegende aktive GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Moleküle durch äußere abgeschirmt werden, so daß sie sterisch für das Substrat nicht erreichbar sind.

GST-Fusionsproteine enthalten eine Thrombin-Schnittstelle, um den GST-Tag wieder abzutrennen. Durch Verdau der gereinigten GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit Thrombin läßt sich jedoch kein GST abspalten, so daß die Aggregate ≥ 2 MDa erhalten bleiben. Auch von dem hexameren Protein wird kein GST abgespalten. Die Thrombin-Schnittstelle muß also in der GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase an einer Stelle liegen, die für Thrombin nur schwer bzw. gar nicht zugänglich ist.

Nach der Reinigung der in *E. coli* überexprimierten GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine Glutathion-Sepharose-Säule können etwa 70 μg lösliche hexamere epimerase- und kinaseaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus einem Liter Bakterienkultur isoliert werden. Zum Vergleich, aus 20 g Rattenleber lassen sich 100 μg hexameren Enzym isolieren (Hinderlich et al., 1997).

3.1.3 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit His-Tag

Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit einem GST-Tag wurde die Bildung von Protein-Aggregaten beobachtet. Um zu klären, ob Eigenschaften des GST-Teils oder des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Teils ursächlich für die Bildung der beobachteten Aggregate sind, wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber im pRSET B-Vektor in *E. coli* exprimiert. Der pRSET B/2epi-Vektor wurde in BL21 StarTM(DE3) pLysS *E. coli*-Zellen transformiert, so daß die Bakterien das Enzym mit einem N-terminalen His-Tag exprimieren. Die Selektion der transgenen Bakterien erfolgte durch die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol im Medium.

Es zeigte sich, daß sich die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auch ohne GST-Tag gut in *E. coli* exprimieren ließ und sowohl UDP-GlcNAc-2-Epimerase- als auch ManNAc-Kinase-Aktivität aufwies. Ein erheblicher Anteil epimerase- und

kinaseaktiven Proteins ließ sich im Pellet nachweisen, d.h. es kommt auch hier zur Bildung von Aggregaten. Somit sind nicht Eigenschaften des GST-Teils für die Bildung der Aggregate verantwortlich, sondern Eigenschaften des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Moleküls selbst. Im Vergleich zur GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase verblieb nach dem Aufbrechen der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation ein wesentlich größerer Anteil des Enzyms im Pellet. Im proteinhaltigen Überstand konnten deshalb nur 0,3-0,5 mg/l aktive His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, aber 1-2 mg/l aktive GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase detektiert werden. Der GST-Teil des GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Fusionsproteins erhöht also die Löslichkeit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

Die Firma Invitrogen gibt für die Expression von Proteinen im pRSET-System Werte von 20-50 mg/l an. Die erzielte Expression von 0,3-0,5 mg/l liegt damit etwa um den Faktor hundert niedriger als die Erwartungswerte. Jedoch muß hier berücksichtigt werden, daß der überwiegende Teil der überexprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nach der Lyse der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation nicht im Überstand, sondern als unlösliche Aggregate im Pellet detektiert wird. Die tatsächliche Expressionsrate für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase liegt deshalb wesentlich höher als 0,3-0,5 mg/l.

3.1.4 Reinigung und Charakterisierung der His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert. Dieser kann bei der Proteinreinigung für eine effektive Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarose-Säule genutzt werden. In Anwesenheit von 0,1 mM EDTA bindet das Enzym an die Ni-NTA-Matrix und läßt sich mit 100 mM Imidazol wieder erfolgreich als aktives Protein von der Säule eluieren. So läßt sich eine zu 90% reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isolieren (Abb. 3.2).

Die so gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde anschließend über die Superdex[®]200-Säule gegeben, um die Größe, d.h. den oligomeren Zustand des Proteins zu bestimmen. Dabei zeigte sich, daß im Gegensatz zur GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ausschließlich hexamere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Moleküle detektiert wurden. Enzym-Aggregate wurden nicht nachgewiesen. Die hexamere His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zeigt sowohl UDP-GlcNAc-2-Epimerase-, als auch ManNAc-Kinase-Aktivität.

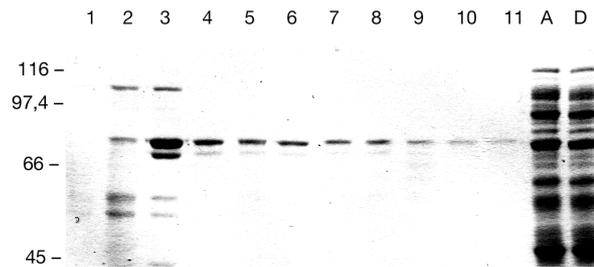


Abbildung 3.2: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen nach der Ni-NTA-Agarose-Säule.

500 ml Bakterien wurden bei 18 °C für 9 h mit 0,03 mM IPTG kultiviert. Nach Aufschluß der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation wird der proteinhaltige Überstand auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgetragen. Die gebundene His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (83 kDa) wird mit 100 mM Imidazol eluiert. (1-11 - Fraktionen nach der Ni-NTA-Agarose-Säule (5 µl), A - Auftrag, D - Durchlauf)

Nach der Reinigung der in *E. coli* überexprimierten His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine Ni-NTA-Agarose-Säule können etwa 80 µg lösliche hexamere epimerase- und kinaseaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus einem Liter Bakterienkultur isoliert werden. Damit lassen sich ähnliche Mengen an überexprimierter hexamerer UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit His-Tag bzw. GST-Tag aus Bakterien isolieren.

3.1.5 Versuche zum Auflösen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate

Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *E. coli* wurde stets die Bildung von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregaten beobachtet. Bis zu 80% des überexprimierten Enzyms liegt in solchen Aggregaten vor, die mit pelletiert werden, wenn die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert werden. Damit müssen bereits bei diesem Schritt erhebliche Ausbeuteverluste hingenommen werden. Außerdem handelt es sich bei den Aggregaten zumindest zum Teil um epimerase- und kinaseaktives Protein. Deshalb wurde versucht, durch Zugabe verschiedener Chemikalien beim Aufbrechen der Zellen die Aggregate aufzulösen. Durch Zugabe von Salzen sollten hydrophile Kräfte verringert werden, durch Zugabe von Glycerin hydrophobe Wechselwirkungen unterbunden werden, und durch Zugabe von 8 M Harnstoff sollten die Aggregate denaturiert werden. Es zeigte sich jedoch, daß sich die Aggregate weder durch Inkubation mit 1 M NaCl noch mit 2 M NaCl oder 50% Glycerin oder 8 M Harnstoff zerstören ließen, d.h. daß der Anteil an löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand nicht zunahm.

Bei der Gelfiltration der gereinigten GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurden stets Aggregate ≥ 2 MDa beobachtet. In der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden jedoch ausschließlich UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Monomere detektiert. Daraus muß gefolgert werden, daß die Aggregate nicht durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden können, da ansonsten keine Monomere in der SDS-PAGE nachgewiesen werden könnten. Auch durch Disulfidbrücken können die Aggregate nicht zusammengehalten werden, da diese erst unter reduzierenden Bedingungen aufgebrochen werden, aber bereits im nicht reduzierenden SDS-Gel Monomere detektiert werden.

In der Literatur ist beschrieben worden, daß Dimethylmaleinsäure (DMMA) mit der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten reagieren kann und so starke ionische Wechselwirkungen verringert, wodurch die Dissoziation von Proteinkomplexen bewirkt werden kann (Pavel *et al.*, 1998). Deshalb wurden gereinigte GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate bei pH 8,5 für 1,5 h bei Raumtemperatur mit 3,5 mM DMMA inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine Gelfiltrationssäule gegeben, um zu überprüfen, ob der Anteil hexamerer UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zugenommen hat. Jedoch konnte keine nennenswerte Zunahme der Hexamere beobachtet werden. Zudem konnte nach der DMMA-Behandlung auch keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität mehr detektiert werden. Das heißt, daß die Aggregate der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase vermutlich nicht durch ionische Wechselwirkungen zwischen ϵ -Aminogruppen von Lysinresten und anderen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche zusammengehalten werden. Eine Reaktion des DMMA mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase muß aber stattgefunden haben, da die Enzymaktivität nach der DMMA-Inkubation komplett verloren geht.

3.2 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Hefe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in dem prokaryontischen Organismus *E. coli* funktionell exprimiert wird. Jedoch können nur geringe Mengen an hexamerer UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isoliert werden, ähnlich wie aus Rattenleber. Deshalb wurde nun versucht, das Enzym in dem eukaryontischen, aber noch relativ einfach handhabbaren Organismus Hefe zu exprimieren, zum einen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, zum anderen in der hoch exprimierenden Hefe *Pichia pastoris*.

3.2.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Expression in der Hefe *S. cerevisiae* wurde die cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber aus dem pRSET B/2epi-Vektor über das Restriktionsenzym *Bam*HI in den high-copy *E. coli* / Hefe Shuttlevektor pYES2 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 ansequenziert. 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 uracildefizientem 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 der Hefe *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 Enzymmenge detektiert werden als zu den anderen Zeitpunkten. Im SDS-Polyacrylamidgel konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt β -Galactosidase bzw. UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nachgewiesen werden.

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 OD_{600} 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. Für das *lacZ*-Gen gibt es Angaben für den Genestorm-Kontrollvektor pYES/GS. In diesem Vektor liegt die Expressionsrate für die β -Galactosidase bei $10\text{-}15 \mu\text{g/l/OD}_{600}$. Die erzielte Expression von $30 \mu\text{g/l/OD}_{600}$ β -Galactosidase liegt damit etwa doppelt so hoch wie die Erwartungswerte. Die Proteinexpression ist somit unter optimalen Expressionsbedingungen durchgeführt worden; jedoch liegen die für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase erzielten Proteinmengen mit $34 \mu\text{g/l}$ weit unter den erwarteten Werten von mindestens $100 \mu\text{g/l}$.

Nach dem Aufbrechen der Hefezellen und anschließender Zentrifugation konnte im Gegensatz zu Bakterien keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Pellet nachgewiesen werden. Auch Degradationsprodukte konnten mit einem 15%igen SDS-Gel nicht detektiert werden, so daß die überexprimierten $34 \mu\text{g}$ UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Hefekultur der tatsächlichen Expressionsrate in der Hefe *S. cerevisiae* entsprechen.

3.2.2 Methanol induzierte Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *Pichia pastoris*

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnte in der Hefe *S. cerevisiae* als aktives Protein exprimiert werden, jedoch waren die Expressionsraten nur sehr gering. Deshalb wurde nun versucht, das Enzym in der Hefe *P. pastoris* zu exprimieren, in der die Expressionsraten laut der Firma Invitrogen etwa 10-100 mal höher sind als in *S. cerevisiae*. Zum einen wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem konstitutiven pGAP-Expressionssystem, zum anderen mit dem Methanol-induzierbaren pPICZ-System exprimiert.

P. pastoris ist eine methylo trope Hefe, die fähig ist, Methanol als ihre einzige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Im ersten Schritt wird das Methanol dabei durch

die Alkoholoxidase unter Verwendung von molekularem Sauerstoff zu Formaldehyd oxidiert. Da die Alkoholoxidase (AOX) nur eine geringe Affinität zu molekularem Sauerstoff aufweist, kompensiert *P. pastoris* diesen Nachteil durch Produktion großer Enzymmengen. Der durch Methanol induzierbare AOX-Promotor reguliert dabei die Synthese der Alkoholoxidase. Zwei Gene in *P. pastoris* kodieren für die Alkoholoxidase, das *AOX1*- und das *AOX2*-Gen. Die größte Enzymmenge wird vom *AOX1*-Gen synthetisiert, dessen Expression auf einem hohen Niveau reguliert und durch Methanol induziert wird. Hefezellen, die einen Verlust oder eine Schädigung des *AOX1*-Gens aufweisen, müssen den Verlust von nahezu ihrer kompletten Alkoholoxidase-Aktivität hinnehmen. Dies führt zu einem Mut^S-Phänotyp (Methanol utilisation slow), d.h. zu Zellen mit einem stark verlangsamten Wachstum auf methanolhaltigem Medium.

Die *P. pastoris*-pPICZ-Expressionsvektoren enthalten den starken *AOX1*-Promotor. So können unter der Kontrolle dieses Promotors die zu untersuchenden Gene durch Methanol-Induktion hoch exprimiert werden. Das Gen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Not* I aus dem pYES2/2epi-Vektor in die Vektoren pPICZ A bzw. pPICZ α C umkloniert. Der Vektor pPICZ α enthält ein N-terminales sekretorisches Signal, den α -Faktor, so daß in diesem Vektor ein Fusionsprotein von α -Faktor und UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase synthetisiert wird, das anschließend unter Abspaltung des α -Faktors von den Hefezellen ins Medium sezerniert werden sollte. Auf diese Weise soll vermieden werden, daß sich für *P. pastoris* Zellen eventuell toxische UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in den Zellen anreichert.

Die Konstrukte pPICZ A/2epi und pPICZ α C/2epi wurden im 5'-Bereich des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens ansequenziert, um eine eventuell aufgetretene Änderung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich nachzuweisen. Die überprüften Konstrukte wurden anschließend mittels Elektroporation in verschiedene *P. pastoris*-Hefezellen transformiert. Für diese Transformation wurde zum einen der Wildtyp *Pichia*-Stamm X-33 und zum anderen der GS115-Stamm verwendet, der eine Mutation im Histidinol-Dehydrogenase-Gen (*his 4*) trägt. Weiterhin wurde der KM71H-Stamm transformiert, der durch Zerstörung des *AOX1*-Gens einen Mut^S-Phänotyp zeigt.

Bei der Elektroporation wird die Membran der Hefezellen kurzzeitig porös, so daß Plasmid-DNA in die Hefezellen gelangen kann. In den Zellen kann es dann zur homologen Rekombination zwischen der linearisierten Plasmid-DNA und Bereichen des *P. pastoris* Genoms kommen (Abb. 3.3). Homologe Bereiche für ein derartiges Crossover sind der 5'-*AOX1*-Bereich und der *AOX1*-Transkriptionsterminator. Dies führt zur Insertion von einer oder mehreren Kopien des Vektors „upstream“ oder „downstream“ des *AOX1*-Gens im *Pichia*-Genom. Durch eine derartige homologe

Rekombination sind stabile *P. pastoris*-Transformanten entstanden, die in der Lage sind, auf Medium, das das Antibiotikum Zeocin enthält, zu wachsen, da in der pPICZ-Vektor-DNA ein Zeocinresistenz-Gen enthalten ist. Transformanten, bei denen die Vektor-DNA nicht ins Genom integriert hat, können sich auf zeocinhaltigem Medium nicht vermehren, da der pPICZ-Vektor keinen Replikationsursprung für Hefen aufweist.

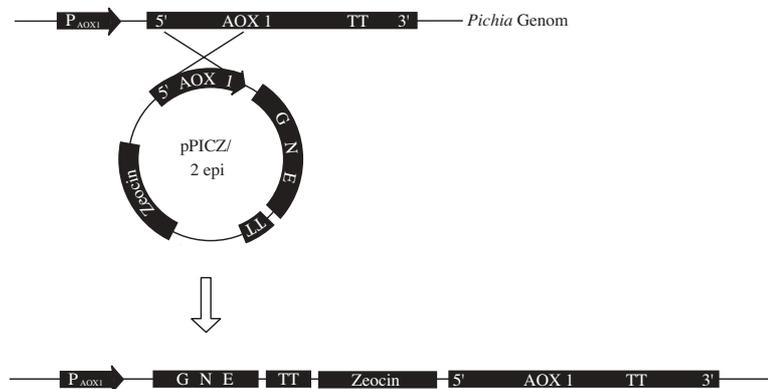


Abbildung 3.3: Homologe Rekombination zwischen dem pPICZ/2epi-Vektor und dem *Pichia pastoris*-Genom.

Kompetente *Pichia pastoris*-Hefezellen werden mit linearisierter Vektor-DNA transformiert. Durch homologe Rekombination zwischen dem 5'-Bereich des *AOX1*-Gens bzw. dem Transkriptionsterminator des *AOX1*-Gens integriert der pPICZ-Vektor in das *Pichia pastoris*-Genom. (GNE = UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen)

Bei Insertion von mehreren Vektor-Kopien ins *Pichia*-Genom sollten Transformanten entstehen, die besonders resistent gegen das Antibiotikum Zeocin sind, da das Zeocinresistenz-Gen mehrfach integriert wurde. Derartige Transformanten wurden durch Kultivierung auf Medien mit hohen Zeocinkonzentrationen selektiert. Bei solchen hochresistenten Hefezellen sollten sich neben dem Zeocinresistenz-Gen auch mehrere Kopien des zu untersuchenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens im Genom befinden, d.h. diese Hefen sollten deutlich größere Mengen an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase exprimieren.

Einzelne Transformanten der Hefestämme X-33, GS115 und KM71H wurden entsprechend den Herstellerangaben in größeren Mengen in glycerolhaltigem Medium angezogen. Beim Erreichen einer OD_{600} von mindestens 2 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in methanolhaltiges Medium überführt, um die Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu induzieren. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Methanol-Induktion wurde jeweils ein Aliquot der Hefezellen geerntet, um die größte Ausbeute an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Abhängigkeit von der Zeit der Methanol-Induktion zu ermitteln. Die geernteten Hefezellen wurden mechanisch mit Glasperlen aufgebrochen und nach Zentrifugation sowohl im proteinhaltigen Überstand als auch im resuspendierten Pellet mit dem Morgan-Elson-Test die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität gemessen. Die

Anwesenheit des Enzyms wurde in einem Western-Blot mit dem Epimerase-Antiserum nachgewiesen. Bei transgenen Hefen, die mit dem pPICZ α C/2epi-Vektor transformiert worden sind, wurde zusätzlich das Medium auf Epimeraseaktivität bzw. Anwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mittels Western-Blot untersucht, da bei diesen Hefen das Enzym ins Medium sezerniert werden sollte. Zur Kontrolle wurden mit den jeweiligen Leervektoren transformierte Hefen den gleichen Analysen unterzogen.

Hefen, die mit dem pPICZ α C/2epi-Vektor transformiert worden sind, sollten die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ins Medium sezernieren. Es zeigte sich jedoch, daß das Enzym zu keinem Zeitpunkt mittels Western-Blot im Medium nachgewiesen werden konnte, noch konnte Enzymaktivität mit dem Morgan-Elson-Test oder dem sehr viel empfindlicheren radioaktiven Epimerase-Assay nachgewiesen werden. Auch ein radioaktiver ManNAc-Kinase-Assay zeigte keine Enzymaktivitäten. Daraus läßt sich schließen, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nicht oder nur in geringen Mengen, die unterhalb der Nachweisgrenzen liegen, ins Medium sezerniert wurde. Um zu überprüfen, ob überhaupt korrektes Protein von den Hefezellen gebildet worden ist, wurden die Hefezellen selbst aufgebrochen und auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase untersucht. Im Western-Blot konnte mit dem α -Faktor gekoppelte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (90,7 kDa) sowohl in den proteinhaltigen Überständen als auch in den resuspendierten Pellets detektiert werden (Abb. 3.4). Mit dem Morgan-Elson-Test bzw. dem radioaktiven Epimerase- und Kinase-Assay konnten gleichzeitig Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Hefezellen epimerase- und kinaseaktives Enzym bilden, das auch mit dem α -Faktor, dem sekretorischen Signal, gekoppelt ist. Jedoch wird das Enzym nicht oder nur zu äußerst geringen Teilen ins Medium sezerniert. Eine sekretorische Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem α -Faktor als sekretorisches Signal ist demnach nicht möglich.

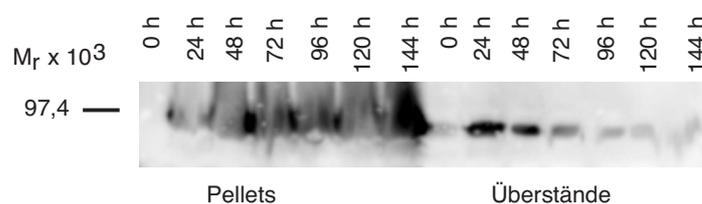


Abbildung 3.4: Mit dem Methanol-induzierbaren pPICZ-System in *Pichia pastoris* überexprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Methanol-Induktion wurden mit pPICZ α C/2epi transformierte KM71H-Hefezellen geerntet und mit Glasperlen mechanisch aufgebrochen. Nach anschließender Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand und das resuspendierte Pellet auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Western-Blot mit dem Epimerase-Antiserum nachgewiesen.

Nach dem Aufbrechen der Hefezellen konnte mittels Western-Blot sowohl im proteinhaltigen Überstand als auch im resuspendierten Pellet UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase detektiert werden. Die überwiegende Menge der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde dabei im Pellet nachgewiesen (Abb. 3.4). Analog zu den Bakterien muß vermutet werden, daß es auch bei der Überexpression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *P. pastoris* zu einer Aggregation von aktivem Enzym in den Hefezellen kommt. Aufgrund ihrer Größe werden diese Aggregate nach dem Aufbrechen der Hefezellen beim anschließenden Zentrifugieren pelletiert und damit im Western-Blot im resuspendierten Pellet nachgewiesen.

Auch bei der intrazellulären Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde aktives Enzym sowohl in den proteinhaltigen Überständen als auch in den resuspendierten Pellets nachgewiesen. Die überwiegende Menge des Enzyms wurde dabei, genau wie bei der sekretorischen Expression, im Pellet detektiert. Es konnte damit kein Unterschied zwischen der sekretorischen und der intrazellulären Expression beobachtet werden, so daß im folgenden, soweit nicht anders vermerkt, nicht mehr zwischen sekretorischer und intrazellulärer Expression unterschieden wird.

Die höchste Ausbeute an überexprimierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase variiert etwas zwischen den einzelnen Transformanten, konnte im Mittel aber etwa 48 h nach der Methanol-Induktion detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die nachgewiesenen Enzymaktivitäten am größten (Abb. 3.5). Nach spätestens 72 h nahm die Menge an überexprimiertem Protein wieder ab. Diese Beobachtungen gelten für die im proteinhaltigen Überstand lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Auch im resuspendierten Pellet nimmt die Menge an exprimiertem Enzym bis etwa 48 h stetig zu, sinkt danach jedoch nicht wieder ab (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis von löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand zu aggregiertem Enzym im resuspendierten Pellet verschiebt sich während der Methanol-Induktion also immer weiter in Richtung aggregierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Pellet. Damit sollten die Hefezellen etwa 48 h nach der Methanol-Induktion geerntet werden, um die höchsten Ausbeuten an überexprimiertem löslichem Enzym zu erzielen.

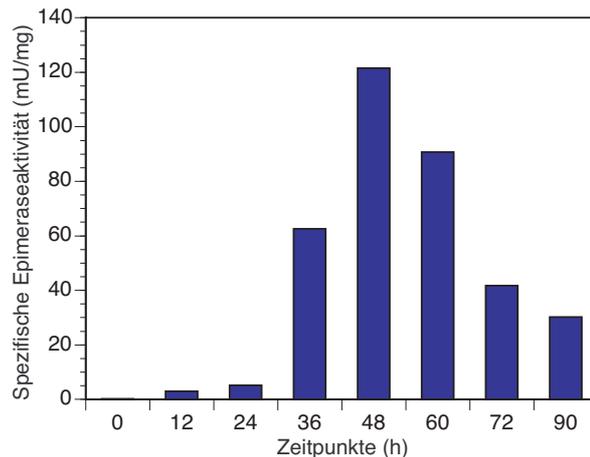


Abbildung 3.5: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Zeit der Methanol-Induktion.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Methanol-Induktion wurden mit pPICZ/2epi transformierte GS115-Hefezellen geerntet und mit Glasperlen mechanisch aufgebrochen. Nach anschließender Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand jeweils mittels Morgan-Elson-Test auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität untersucht. Die ermittelten Werte wurden in Relation zur gesamten Proteinmenge gesetzt, so daß sich die spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität ergibt.

Unabhängig von den verwendeten Hefestämmen, dem X-33, dem GS115 oder dem KM71H, und auch unabhängig, ob die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in dem pPICZ- oder mit dem pPICZ α -Vektor exprimiert wurde, wurde die höchste Expressionsrate des Enzym in den Hefezellen jeweils immer etwa 48 h nach Methanol-Induktion gemessen. Auch bei dem Verhältnis lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand zu UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im resuspendierten Pellet ergibt sich kein offensichtlicher Unterschied zwischen den einzelnen Hefestämmen.

Um den oligomeren Zustand des überexprimierten Enzym zu bestimmen, wurde der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Hefezellen und anschließender Zentrifugation über die Superdex[®]200-Säule gegeben. Dabei zeigte sich, daß die lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase fast ausschließlich als epimerase- und kinaseaktives Hexamer vorliegt, unabhängig von den verwendeten Hefestämmen. Bei einigen Aufarbeitungen konnten Spuren von epimeraseaktiven Aggregaten ≥ 2 MDa detektiert werden.

Aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten des radioaktiven Epimerase-Assays läßt sich für jeden Transformanten die Menge an aktivem überexprimiertem Enzym im proteinhaltigen Überstand berechnen. In Tab. 3.1 sind diese Werte nach den verwendeten Hefestämmen sortiert dargestellt.

Tabelle 3.1: Lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand in μg pro Liter Hefekultur.

Für die verwendeten Hefestämme X-33, GS115 und KM71H wurde für mehrere Transformanten jeweils die Menge an überexprimierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand bestimmt. Dabei wurde zwischen Transformanten, die auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin kultiviert wurden, und dem Phänotyp, Mut⁺ (+) bzw. Mut^S (S), unterschieden.

X-33		GS115		KM71H	
	$\mu\text{g}/\text{l}$		$\mu\text{g}/\text{l}$		$\mu\text{g}/\text{l}$
Klon 1; 500; +	1,5	Klon 1; 500; S	186	Klon 1; 500; S	204
Klon 2; 500; +	13	Klon 2; 500; +	100	Klon 2; 500; S	36
Klon 3; 500; +	27	Klon 3; 500; +	184	Klon 3; 500; S	50
Klon 4; 500; +	13	Klon 4; 500; +	140	Klon 4; 100; S	148
Klon 5; 500; +	21	Klon 5; 100; +	188		
Klon 6; 500; +	22	Klon 6; 100; +	96		
Klon 7; 500; +	6				
Klon 7; 500; +	1,5				
Klon 8; 100; +	4				

Deutlich ist zu erkennen, daß Transformanten des Hefestamms X-33 nur zwischen 1,5 und 27 μg UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Hefekultur exprimieren, während Transformanten der Hefestämme GS115 und KM71H etwa 100-200 μg bzw. 30-200 μg Enzym pro Liter Hefekultur exprimieren. Der Anteil löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand variiert bei den KM71H-Transformanten etwas stärker als bei den GS115-Transformanten. Jedoch zeigen beiden Stämme im Mittel eine um den Faktor 10 höhere Expression als der Hefestamm X-33. Die exprimierten Enzym-Mengen in den Methanol-induzierten *P. pastoris*-Hefezellen liegen damit jedoch noch weit unter denen von Bakterien - Bakterien exprimieren 300-500 μg aktive lösliche His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, d.h. etwa dreimal mehr Enzym pro Liter Kultur.

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsprotokolle für Mut⁺- und Mut^S-Transformanten, erreichen die Hefestämme verschiedene Zelldichten zum Zeitpunkt des Erntens. Bezogen auf die Zellzahl zum Zeitpunkt des Erntens werden vom X-33-Hefestamm etwa 1,5-27 μg UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro 2×10^{11} Hefezellen, beim GS115-Hefestamm etwa 100-200 μg pro 2×10^{11} Hefezellen und beim KM71H-Hefestamm etwa 30-200 μg Enzym pro 2×10^{12} Hefezellen, d.h. etwa 3-20 μg pro 2×10^{11} Hefezellen exprimiert. Damit wird lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bezogen auf die Zellzahl von den Hefestämmen KM71H und X-33 in ähnlichen Größenordnungen exprimiert. Bei dem GS115-Hefestamm liegt der Anteil löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase etwa um den Faktor 10 höher.

Transformanten, die in der Lage sind, auf Medien mit höheren Zeocinkonzentrationen zu wachsen, haben mehrere Kopien des Zeocinresistenz-Gens in ihrem Genom integriert. Bei diesen Transformanten sollten sich auch mehrere Kopien des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens im Genom befinden, d.h. diese Hefen sollten deutlich größere Mengen an Protein exprimieren. Ein Vergleich der exprimierten löslichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von Transformanten, die auf 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin mit solchen die auf 500 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin kultiviert wurden, zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsmenge. Dies kann daran liegen, daß hier nur die Anteile an löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in den proteinhaltigen Überständen nach dem Aufbrechen der Zellen miteinander verglichen wurden. Der größte Anteil an überexprimiertem Protein befindet sich jedoch als unlösliche Aggregate im resuspendierten Pellet. Unabhängig vom verwendeten Hefestamm besteht für den Anteil der löslichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kein Unterschied zwischen den einzelnen Transformanten, die auf 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin und solchen, die auf 500 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin kultiviert wurden.

Der pPICZ bzw. der pPICZ α -Vektor integriert über homologe Rekombination ins Genom von *P. pastoris*. Dabei kann es in einigen Fällen zu einer fehlerhaften Insertion kommen, was zu einer Zerstörung des *AOX1*-Gens führt. Derartige Mutanten zeigen einen Mut^{S} -Phänotyp, d.h. ein stark verlangsamtes Wachstum auf methanolhaltigem Medium. In vielen Fällen liegen die Expressionsraten von Mut^{S} -Hefen weit unter denen von $\text{Mut}^{\text{+}}$ -Hefezellen. Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von löslichem Protein in Mut^{S} bzw. $\text{Mut}^{\text{+}}$ -Hefezellen beobachtet werden. Dies kann wieder daran liegen, daß hier nur die Anteile an löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in den proteinhaltigen Überständen nach dem Aufbrechen der Zellen miteinander verglichen wurden. Der größte Anteil des Enzyms befindet sich jedoch als unlösliche Aggregate im resuspendierten Pellet, so daß die tatsächlichen Expressionsraten durchaus unterschiedlich sein können.

3.2.3 Konstitutive Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in *Pichia pastoris*

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnte mit dem Methanol-induzierbaren pPICZ-Expressionssystem als aktives Protein in der Hefe *P. pastoris* exprimiert werden. Gleichzeitig wurde das Enzym mit dem konstitutiven pGAP-System exprimiert. Bei der Expression mit dem pGAP-System wird das zu untersuchende Gen unter die Kontrolle des GAP-Promotors gebracht, der die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase reguliert. Sie wird in vielen Organismen

konstitutiv in großen Mengen exprimiert, so auch in *P. pastoris*. Werden andere Gene unter die Kontrolle des GAP-Promotors gebracht, werden auch sie in großen Mengen exprimiert.

Für die Expression mit dem pGAP-System wurde die cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus dem pPICZ A/2epi-Vektor mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Not* I in die Vektoren pGAPZ A bzw. pGAPZ α C kloniert. Der Vektor pGAPZ α enthält, genau wie der pPICZ α -Vektor, den α -Faktor als N-terminales sekretorisches Signal, so daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von den Hefezellen ins Medium sezerniert werden sollte. Um eventuell aufgetretene Änderungen der Nukleotidsequenz im 5'-Bereich des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens auszuschließen, wurden die Konstrukte pGAPZ A/2epi und pGAPZ α C/2epi ansequenziert. Anschließend wurden sie mittels Elektroporation in *P. pastoris*-Hefezellen des Wildtyp-Stammes X-33 transformiert. In den Hefezellen kann es dann zur homologen Rekombination zwischen dem 5'-GAP-Bereich bzw. dem GAP-Transkriptionsterminator der linearisierten Plasmid-DNA und entsprechenden Bereichen des *P. pastoris*-Genoms kommen (analog Abb. 3.3). Dadurch gelangen das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen und das Zeocinresistenz-Gen unter die Kontrolle des pGAP-Promotors. Durch derartige homologe Rekombination entstandene stabile *P. pastoris*-Transformanten wurden auf zeocinhaltigem Medium selektiert.

Einzelne Transformanten wurden entsprechend den Herstellerangaben in größeren Mengen in YPD-Medium angezogen. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 h wurde jeweils ein Aliquot abgenommen, um die größte Ausbeute an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Abhängigkeit von der Wachstums-, d.h. Expressionszeit zu ermitteln. Die geernteten Hefezellen wurden mechanisch mit Glasperlen aufgebrochen und nach Zentrifugation sowohl im proteinhaltigen Überstand als auch im resuspendierten Pellet mit dem Morgan-Elson-Test die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten gemessen. Außerdem wurde ein Teil des proteinhaltigen Überstandes und des resuspendierten Pellets auf ein 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen, um die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in einem Western-Blot mit dem Epimerase-Antiserum nachzuweisen. Bei transgenen Hefen, die mit dem pGAP α C/2epi-Vektor transformiert worden sind, wurde zusätzlich das Medium auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität bzw. Anwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mittels Western-Blot untersucht, da bei diesen Hefen die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ins Medium sezerniert werden sollte. Zur Kontrolle wurden mit den jeweiligen Leervektoren transformierte Hefen den gleichen Analysen unterzogen.

Hefen, die mit dem pGAPZ α C/2epi-Vektor transformiert worden sind, sollten die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ins Medium sezernieren. Es zeigte sich jedoch, daß zu keinem Zeitpunkt UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mittels Western-Blot im Medium nachgewiesen werden konnte. Auch Enzymaktivitäten konnten weder mit dem sehr empfindlichen radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase- noch dem ManNAc-Kinase-Assay nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß, genau wie bei der Expression mit dem pPICZ-System, auch hier das Enzym nicht oder nur in so geringen Mengen, die unterhalb der Nachweisgrenzen liegen, ins Medium sezerniert wurde. Korrekte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, d.h. mit dem α -Faktor gekoppeltes Enzym, konnte allerdings nach dem Lysieren der Hefezellen und anschließender Zentrifugation sowohl im proteinhaltigen Überstand als auch im resuspendierten Pellet mittels Western-Blot detektiert werden. Mit dem Morgan-Elson-Test bzw. dem radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Assay konnten gleichzeitig Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Hefezellen epimerase- und kinaseaktives Protein bilden, das auch mit dem α -Faktor, dem sekretorischen Signal, gekoppelt ist. Eine sekretorische Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem α -Faktor als sekretorisches Signal ist jedoch auch mit dem pGAP-Expressionssystem nicht möglich.

Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem pGAP-System wurde, wie auch beim pPICZ-Expressionssystem, die überwiegende Menge des Enzyms mittels Western Blot im resuspendierten Pellet nachgewiesen. Da gleichzeitig UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivitäten detektiert werden konnten, kommt es vermutlich auch in den mit pGAPZ/2epi transformierten X-33-Hefezellen zu einer Aggregation von aktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Diese Aggregate werden aufgrund ihrer Größe nach dem Aufbrechen der Hefezellen beim anschließenden Zentrifugieren pelletiert und werden damit im Western-Blot im resuspendierten Pellet nachgewiesen. Bei diesen Beobachtungen konnte kein Unterschied zwischen der Expression mit dem pGAPZ α /2epi-Vektor und der intrazellulären Proteinexpression ermittelt werden.

Die höchste Ausbeute an überexprimierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase variiert etwas zwischen den einzelnen Transformanten, konnte im Mittel aber etwa nach 48 h bis 72 h Inkubationszeit detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die nachgewiesenen Enzymaktivitäten am größten (Abb. 3.6). Anschließend nahm die Menge an überexprimiertem Enzym wieder leicht ab. Diese Beobachtungen gelten sowohl für die im proteinhaltigen Überstand lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, als auch für die unlöslichen Aggregate im resuspendierten Pellet. Damit sollten die Hefezellen etwa nach 48 h bis 72 h Inkubationszeit geerntet werden, um die höchsten Ausbeuten an überexprimierter löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu erzielen.

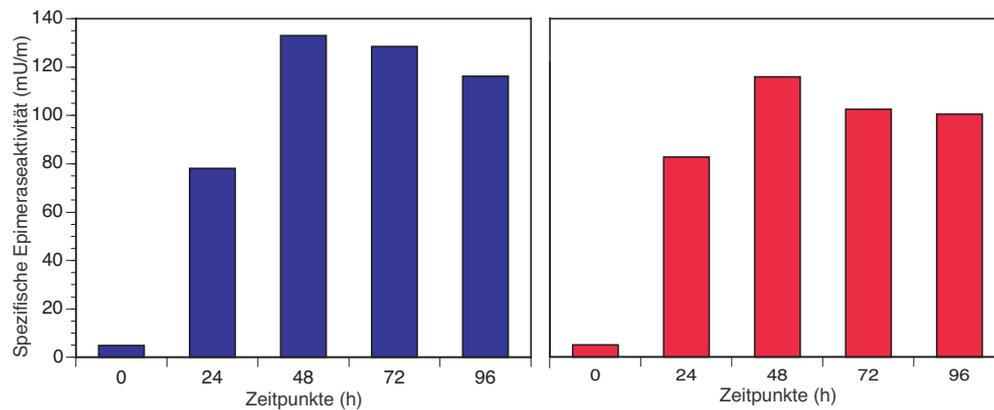


Abbildung 3.6: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten im proteinhaltigen Überstand (links) und im resuspendierten Pellet (rechts).

Mit pGAPZ/2epi transformierte X-33 Hefezellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mit Glasperlen mechanisch aufgebrochen. Nach anschließender Zentrifugation wurden der proteinhaltige Überstand und das resuspendierte Pellet jeweils mittels Morgan-Elson-Test auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität untersucht. Die ermittelten Werte wurden in Relation zur gesamten Proteinmenge gesetzt, so daß sich die spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität ergibt.

Um den oligomeren Zustand der überexprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu ermitteln, wurde der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Hefezellen und anschließender Zentrifugation auf die Superdex[®]200-Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend mittels Morgan-Elson-Test auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität untersucht. Die größte Enzymaktivität wurde in Fraktionen gemessen, deren Elutionsvolumen etwa 450 kDa entspricht. Damit liegt das Enzym wie erwartet als Hexamer vor. Mit den sehr spezifischen und empfindlichen radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Assay konnten gleichzeitig beide Enzymaktivitäten des bifunktionellen Enzyms nachgewiesen werden. Damit konnte auch mit dem pGAP-System lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand als hexamerer epimerase- und kinaseaktives Protein exprimiert werden.

Für jeden einzelnen Transformanten läßt sich die Menge an aktiver überexprimierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten des radioaktiven Epimerase-Assays berechnen (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand in μg pro Liter Hefekultur.

Es wurde jeweils die Menge an überexprimierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von mehreren Transformanten bestimmt. Dabei wurde zwischen Transformanten, die auf $100 \mu\text{g/ml}$ und solchen, die auf $500 \mu\text{g/ml}$ Zeocin kultiviert wurden und zwischen intrazellulärer bzw. sekretorischer Expression, unterschieden.

	$\mu\text{g/l}$
Klon 1; 100; sekretorisch	16
Klon 2; 100; sekretorisch	18
Klon 3; 100; intrazellulär	126
Klon 4; 500; sekretorisch	406
Klon 5; 500; intrazellulär	208

Transformanten, die in der Lage sind, auf Medium mit höheren Zeocinkonzentrationen zu wachsen, zeigen eine höhere Expression von löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als solche, die auf niedrigeren Zeocinkonzentrationen kultiviert wurden. Die auf $500 \mu\text{g/ml}$ Zeocin kultivierten Transformanten synthetisieren $200\text{-}400 \mu\text{g/l}$ UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase und damit etwa sechsmal mehr Protein als die auf $100 \mu\text{g/ml}$ Zeocin kultivierten Hefen, die nur $20\text{-}120 \mu\text{g/l}$ Enzym bilden. Hefen, die auf Medien mit höheren Zeocinkonzentrationen wachsen, sollten mehrere pGAP-Vektoren aufgenommen haben und damit auch mehrere Kopien des Zeocinresistenz-Gens besitzen. Diese Transformanten sollten damit auch mehrere Kopien des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens besitzen, wodurch sie deutlich größere Mengen an Enzym exprimieren können als solche, die weniger Kopien enthalten.

Hefezellen, die auf $100 \mu\text{g/ml}$ Zeocin kultiviert wurden, zeigen für die sekretorische Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wesentlich niedrigere Expressionen als für die intrazelluläre Expression. Hefezellen, die auf $500 \mu\text{g/ml}$ Zeocin kultiviert wurden, zeigen dagegen bei der sekretorischen Expression höhere Expressionen. Um eindeutige Aussagen über die überexprimierte Proteinmenge bei der sekretorischen und der intrazellulären Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu treffen, müssen weitere Transformanten analysiert werden.

Mit pGAPZ/2epi bzw. pGAPZ α /2epi transformierte X-33 Hefezellen exprimieren bis zu $400 \mu\text{g}$ lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Hefekultur, wobei jedoch ein großer Unterschied zwischen den Expressionsraten der einzelnen Transformanten besteht. Bezogen auf die Zellzahl zum Zeitpunkt des Erntens wären das $400 \mu\text{g}$ pro 5×10^{11} Hefezellen, d.h. $160 \mu\text{g}$ pro 2×10^{11} Hefezellen. Verglichen mit dem pPICZ-Expressionssystem entspricht das in etwa den Expressionsraten im GS115-Stamm von $100\text{-}200 \mu\text{g}$ pro 2×10^{11} Hefezellen. Allerdings variiert der Anteil

an löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bei den mit pGAPZ/2epi transformierten X-33 Hefen wesentlich stärker als bei den mit pPICZ/2epi transformierten GS115 Hefen.

3.3 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Insektenzellen

In der Hefe *P. pastoris* konnten bis zu 400 μg und in Bakterien etwa 1 mg UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Hefe- bzw. Bakterienkultur exprimiert werden. Für zahlreiche Versuche, wie zum Beispiel Strukturuntersuchungen werden jedoch einige Milligramm gereinigtes Protein benötigt. Deshalb sollte nun versucht werden, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem „Baculovirus Expression Vector System“ (BEVS) in Insektenzellen zu exprimieren. Mit diesem System können rekombinante Proteine exprimiert werden, die dann bis zu 50% des gesamten Insektenzellproteins ausmachen können. Baculoviren gehören zu einer Gruppe von Viren mit einem großen doppelsträngigen ringförmigen DNA-Genom, die sich vor allem in Insekten vermehren und dabei eine hohe Wirtsspezifität aufweisen. Aufgrund ihres flexiblen stäbchenförmigen Capsids sind sie in der Lage, größere Mengen an fremder DNA aufzunehmen. Für die meisten Expressionsexperimente wird der *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) verwendet. Als Wirtszellen haben sich Sf9-Zellen (aus *Spodoptera frugiperda*) und High Five-Zellen (aus *Tricholusia ni*) etabliert, da sie sowohl adhärent als auch in Suspension sehr gut wachsen. Infektiöse Viren werden von den Insektenzellen durch Fusion oder Endocytose aufgenommen und die virale DNA in den Zellkern eingeschleust. Dort beginnt nach etwa 6 h die Replikation der viralen DNA und der Zusammenbau von Viruspartikeln (frühe Phase). Etwa 12 h nach der Infektion werden die ersten Viruspartikel durch Knospung freigesetzt und infizieren weitere Zellen (späte Phase). 24 h nach der Infektion werden große Mengen der Strukturproteine Polyhedrin und p10 im Kern gebildet (sehr späte Phase), die die Viruspartikel mit einer kristallinen Proteinhülle umgeben, um sie nach der Lyse der Insektenzelle zu schützen.

Wegen der Größe des viralen Genoms wird das zu untersuchende Gen nicht direkt in die Virus-DNA inseriert, sondern zunächst in ein Transfer-Plasmid unter die Kontrolle eines Baculovirus-Promotors, oft des starken Polyhedrin-Promotors, kloniert. Das zu exprimierende Gen wird 5' und 3' von viraler DNA flankiert, so daß durch homologe Rekombination zwischen Transfer-Plasmid und Baculovirus-DNA (Bacmid) rekombinanter Baculovirus gebildet wird, der das zu untersuchende Gen enthält.

3.3.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mit dem BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystem

Um die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Insektenzellen zu exprimieren, wurde die cDNA des Enzyms aus Rattenleber über die Restriktionsenzyme *Xho* I und *Kpn* I aus dem pRSET B/2epi-Vektor in das Donor-Plasmid pFASTBAC1 umklontiert. Um das Enzym mit einem N-terminalen His-Tag zu exprimieren, wurde es außerdem in den pFASTBACHTA-Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden im 5'-Bereich des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gens ansequenziert, um eine eventuell aufgetretene Änderung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich auszuschließen. Die überprüften Konstrukte wurden anschließend in *E. coli* DH10BAC-Zellen transformiert. Diese Zellen enthalten Baculovirus-DNA und ein Helfer-Plasmid, welches die für die homologe Rekombination notwendigen Proteine zur Verfügung stellt. Durch gerichtete Transposition zwischen den Tn7-Transposon-Elementen des Bacmids und des Donor-Plasmids entsteht rekombinante Bacmid-DNA, die das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthält. Kolonien mit solchen rekombinanten Bacmiden wurden durch Antibiotika-Selektion und Blau-Weiß-Selektion identifiziert, da die Transposition zu einer Zerstörung des *lacZ*-Gens führt. Aus weißen Klonen wurde die rekombinante Bacmid-DNA isoliert und für die Transfektion von Insektenzellen eingesetzt. Nach entsprechender Stimulation durch ein lipidhaltiges Reagenz wird die Bacmid-DNA von den Insektenzellen aufgenommen und nach einigen Tagen rekombinanter Baculovirus gebildet, der das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthält (Abb. 3.7). Nachdem der Titer, d.h. die Anzahl infektiöser Viruspartikel ermittelt wurde, wurden Insektenzellen mit dem rekombinanten Baculovirus infiziert.

Mit den rekombinanten Baculoviren wurden Insektenzellen infiziert, zum einen Sf9-Zellen und zum anderen High Five-Zellen. Die Sf9-Zellen werden in serumfreiem Medium kultiviert (Sf-900 II-Zellen), wie auch in serumhaltigem Medium (Sf9-Zellen). Um die optimalen Expressionsbedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, wurden Expressionen mit diesen drei Zelllinien, verschiedenen Infektionszeiten und verschiedenen MOI (Multiplicity of Infection) durchgeführt.

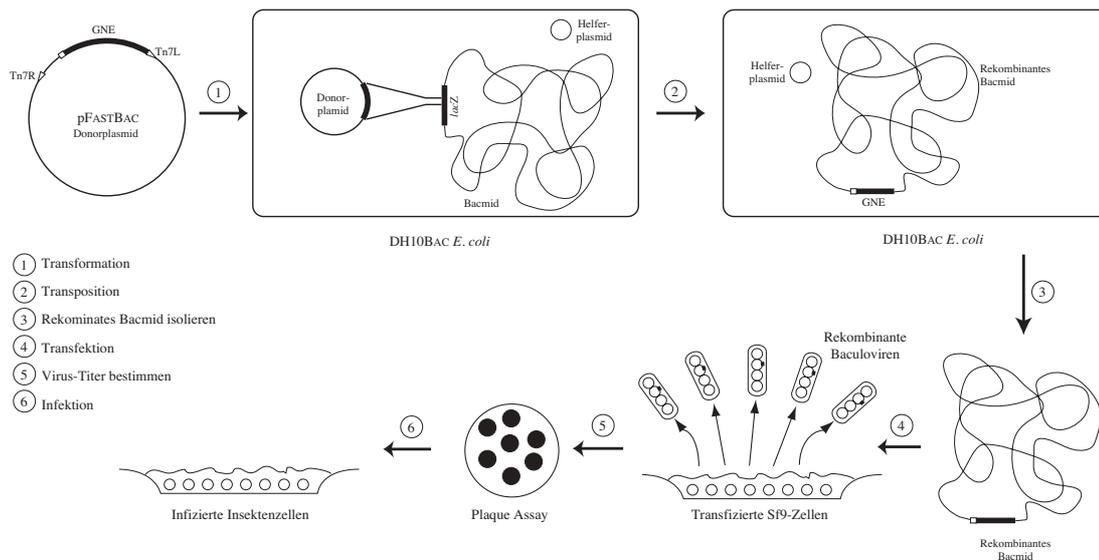


Abbildung 3.7: Herstellung von rekombinantem Baculovirus und Genexpression mit dem BAC-TO-BAC-Expression-System.

Das zu untersuchende Gen wird in ein pFASTBAC-Donorplasmid kloniert und das rekombinante Plasmid in DH10BAC-Zellen transformiert, die Bacmid-DNA mit zwei Tn7-Elementen und ein Helfer-Plasmid enthalten. Zwischen den Tn7-Elementen des Bacmids und den Tn7-Elementen des pFASTBAC-Donor-Plasmids findet in Anwesenheit der vom Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellten Transpositionsproteine eine gerichtete Transposition statt. Kolonien mit rekombinanten Bacmiden werden durch Zerstörung des *lacZ*-Gens identifiziert. Von ausgewählten Klonen mit rekombinantem Bacmid wird hochmolekulare DNA isoliert und diese anschließend zur Transfektion von Insektenzellen benutzt.

Um die Expressionsraten für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Sf9-, Sf-900 II- und High Five-Zellen zu vergleichen, wurden die Zellen mit einer MOI von 3 infiziert, da sich dieser Wert für zahlreiche Proteine als Optimum herausgestellt hat. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und die spezifischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten des proteinhaltigen Überstandes ermittelt (Abb. 3.8).

Sf9-Zellen bilden die geringsten Mengen an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Am meisten Enzym wird im Mittel von den High Five-Zellen synthetisiert, jedoch liegen die Expressionsraten der Sf900 II-Zellen nur geringfügig niedriger. Aus der Literatur ist bekannt, daß High Five-Insektenzellen im Vergleich zu Sf9- bzw. Sf-900 II-Insektenzellen für viele Proteine bis zu siebenfach höhere Expressionsraten aufweisen (Vallazza und Petri, 1999). Die Expressionsrate für UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in High Five-Zellen liegt jedoch nur etwas über der von Sf-900 II-Zellen. Ein zehnfach höherer Wert war aber auch nicht zu erwarten, da bereits bei den Sf-900 II-Zellen bis zu 30% des Gesamtproteins überexprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sind und somit eine weitere Steigerung kaum noch möglich ist. Zudem schwanken die Epimerasekonzentrationen bei den High Five-Zellen im Vergleich zu den Sf-900 II-Zellen recht stark. Aus diesen Gründen wird in den folgenden Versuchen mit den Sf-900 II-Zellen gearbeitet.

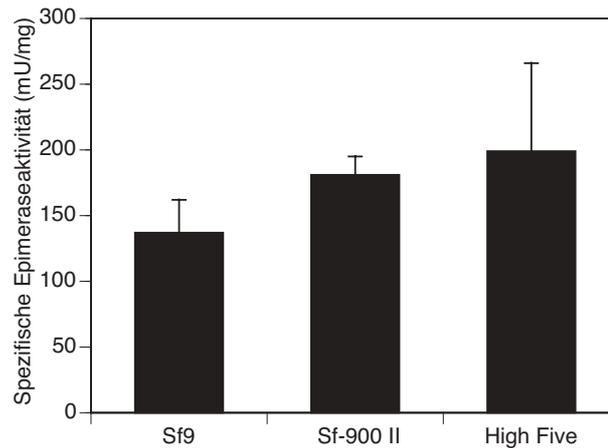


Abbildung 3.8: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von Sf9-, Sf-900 II- und High Five-Zellen nach Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus.

Die Insektenzellen wurden für 48 h bei einer MOI von 3 mit rekombinantem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Baculovirus kultiviert. Anschließend wurden die geernteten Insektenzellen mit Ultraschall aufgeschlossen, das Lysat zentrifugiert und im proteinhaltigen Überstand die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität mittels Morgan-Elson-Test ermittelt. In Bezug auf die gesamte Proteinmenge ergeben sich aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ($n = 5$; $\bar{x} \pm \sigma$).

In einem weiteren Versuch sollte die optimale Inkubationszeit der Insektenzellen mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus ermittelt werden. Dafür wurden Sf-900 II-Zellen mit dem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei einer MOI von 3 infiziert. Nach 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84 und 96 h wurde jeweils ein Aliquot der Zellen geerntet, mittels Ultraschall aufgebrochen und jeweils die spezifischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt (Abb. 3.9).

Es ist deutlich zu sehen, daß die relative UDP-GlcNAc-2-Epimerasemenge zunächst stetig ansteigt, zwischen 48 und 60 h ihr Maximum erreicht und dann wieder abfällt, da die Zellen durch die Viren zunehmend lysiert werden und damit das Protein ins Medium freisetzen. Deshalb werden die Zellen in den folgenden Versuchen nach einer Inkubationszeit von 48 bis 60 h geerntet.

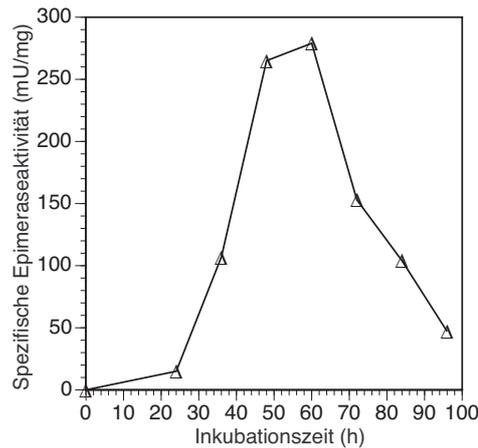


Abbildung 3.9: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nach unterschiedlich langer Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus.

Sf-900 II Insektenzellen wurden für einen unterschiedlichen Zeitraum bei einer MOI von 3 mit rekombinalem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Baculovirus kultiviert. Anschließend wurden die geernteten Insektenzellen mit Ultraschall aufgeschlossen, das Lysat zentrifugiert und im proteinhaltigen Überstand die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität mittels Morgan-Elson-Test ermittelt. In Bezug auf die gesamte Proteinmenge ergeben sich aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten.

In einem weiteren Versuch wurde die für die Infektion mit dem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus optimale MOI ermittelt. Dafür wurden Sf-900 II-Zellen mit dem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei verschiedenen MOI infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mittels Ultraschall aufgebrochen und jeweils die spezifischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt (Abb. 3.10).

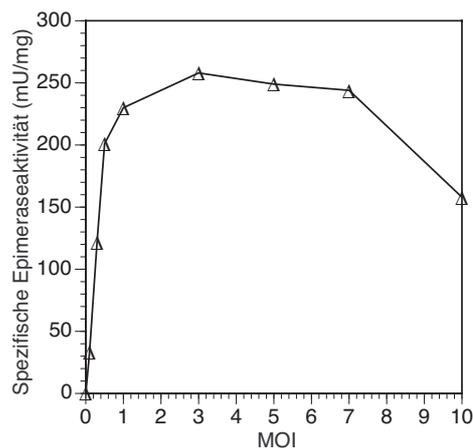


Abbildung 3.10: Spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nach Inkubation mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei verschiedenen MOI.

Sf-900 II Insektenzellen wurden für 48 h bei verschiedenen MOIs mit rekombinalem UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Baculovirus kultiviert. Anschließend wurden die geernteten Insektenzellen mit Ultraschall aufgeschlossen, das Lysat zentrifugiert und im proteinhaltigen Überstand die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität mittels Morgan-Elson-Test ermittelt. In Bezug auf die gesamte Proteinmenge ergeben sich aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten.

Es konnte gezeigt werden, daß bereits bei einer MOI von 0,1 UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in größerer Menge nachweisbar ist. Die Expressionsrate nimmt mit höheren Viruskonzentrationen jedoch noch stetig zu und erreicht um MOI 3 ihr Maximum. Bei noch höheren Viruskonzentrationen fällt die Expressionsrate wieder ab, da die Insektenzellen durch die hohe Virusanzahl zu schnell lysiert werden. Da die relative Epimerasemenge bei MOI 1 nicht wesentlich geringer ist als bei MOI 3, wird in den folgenden Versuchen mit MOI 1 infiziert.

Unter den ermittelten optimalen Expressionsbedingungen, d.h. einer 48 h-Inkubation von Sf-900 II-Zellen mit rekombinantem Baculovirus bei einer MOI von 1, werden von den Insektenzellen zwischen 50 und 100 mg aktive lösliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Insektenkultur exprimiert. Im Vergleich zu Bakterien ist die Ausbeute von löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Kulturvolumen damit um den Faktor 100 höher.

Um die Größe, d.h. den oligomeren Zustand des Enzyms zu bestimmen, wird der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Insektenzellen und anschließender Zentrifugation über die Superdex[®]200-Säule gegeben. Die gesammelten Fraktionen werden anschließend auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivität untersucht. Die größten Enzymaktivitäten wurden in Fraktionen gemessen, deren Elutionsvolumen etwa 450 kDa entspricht. Damit liegt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase fast ausschließlich als Hexamer vor, welches sowohl UDP-GlcNAc-2-Epimerase- als auch ManNAc-Kinase-Aktivität zeigt. Daneben wurde UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase aktives Protein von 220 kDa detektiert, was einem Trimer entspricht. Bei einigen Aufarbeitungen konnten außerdem geringe Mengen von UDP-GlcNAc-2-Epimerase aktiven Aggregaten ≥ 2 MDa detektiert werden.

Auch bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit einem N-terminalen His-Tag wurde nach dem Aufbrechen der Insektenzellen und anschließender Zentrifugation vorwiegend hexameres Enzym im Überstand detektiert, das sowohl UDP-GlcNAc-2-Epimerase- als auch ManNAc-Kinase-Aktivität zeigte. Die spezifischen Enzymaktivitäten entsprechen dabei denen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ohne His-Tag. Damit werden weder die Enzymaktivitäten, noch der oligomere Zustand durch den His-Tag beeinflusst.

3.3.2 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Die Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase gestaltete sich recht schwierig, da das Enzym leicht aggregiert und relativ instabil ist. Deshalb wurde zunächst versucht, die Stabilität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch

Zugabe von Substrat-Derivaten zu erhöhen. Dafür wurde mittels Gelfiltration partiell gereinigtes Enzym mit verschiedenen Substanzen und bei verschiedenen Temperaturen gelagert (Abb. 3.11). Da die Epimeraseaktivität fast ausschließlich auf hexamere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zurückzuführen ist, sind die gemessenen verbleibenden Enzymaktivitäten ein Maß für die Stabilität des hexameren Proteins. Es zeigte sich, daß alle getesteten Substanzen, UDP, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GlcNAc und ManNAc eine stabilisierende Wirkung auf das Enzym haben. GlcNAc und ManNAc haben den größten stabilisierenden Effekt. Da sich diese beiden Substanzen aber störend auf den Morgan-Elson-Test und auch auf die Kinase-Assays auswirken, können sie bei den Aufarbeitungen nicht als Stabilisatoren eingesetzt werden. Auch UDP-GalNAc stabilisiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase recht gut. Diese Substanz ist jedoch zu teuer, um routinemäßig als Stabilisator eingesetzt zu werden. UDP stabilisiert das Enzym zwar etwas schlechter, kann aber aus biochemischen und ökonomischen Gründen sehr gut als Stabilisator eingesetzt werden. Deshalb wird den meisten Puffern für die Proteinaufreinigung 0,1 mM UDP zugesetzt.

Auch die Temperatur hat einen starken Einfluß auf die Stabilität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (Abb. 3.11). Es zeigte sich, daß die Stabilität des Enzyms bei 4 °C bis 14 °C am größten ist, d.h. eine Lagerung des Enzyms sollte bei diesen Temperaturen erfolgen. Höhere Temperaturen oder gar einfrieren, auch unter Zugabe von Glycerin, führen zu einem starken bzw. kompletten Verlust der Enzymaktivität.

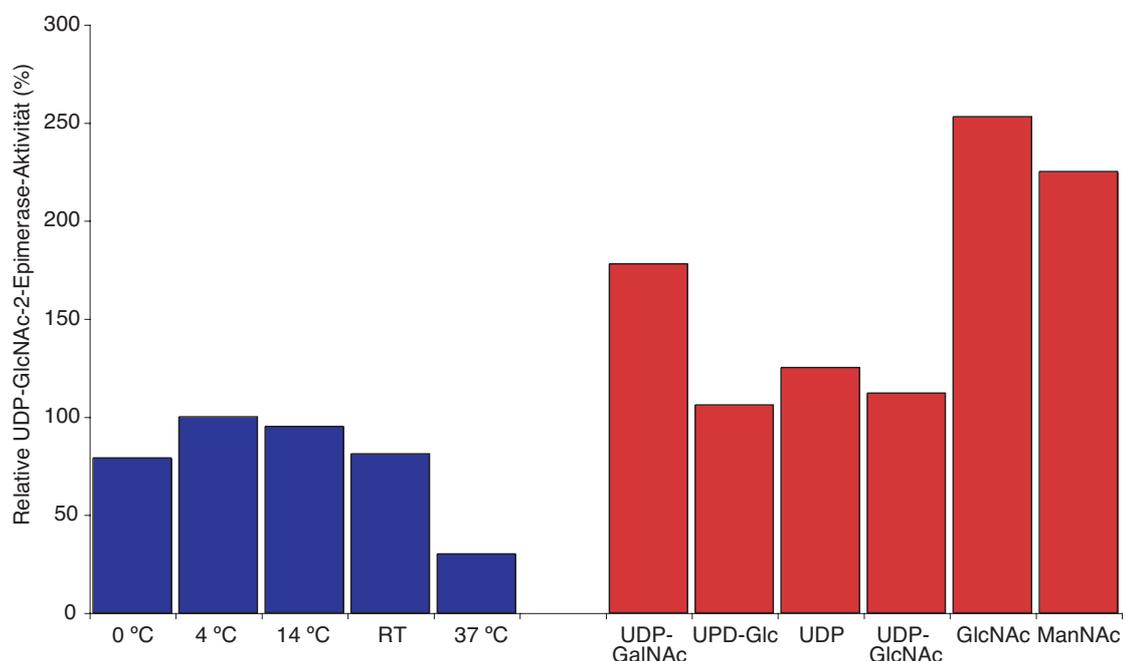


Abbildung 3.11: Einfluß verschiedener Substanzen (rechts) und der Temperatur (links) auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität.

Mittels Gelfiltration und MonoQ-Säule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde für 5 Tage bei verschiedenen Temperaturen bzw. mit verschiedenen Substanzen (1 mM) bei 4 °C gelagert. Die verbleibende relative UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität wurde mit dem Morgan-Elson-Test bzw. dem radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay detektiert.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist ein cytosolisches Protein, d.h. es ist in der Zelle von einem reduzierenden Milieu umgeben. Deshalb wurden den Puffern für die Proteinaufarbeitung reduzierende Reagenzien wie 1 mM DTT zugegeben. Trotzdem ist die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase unter diesen Bedingungen nur für einige Stunden stabil (K. Effertz, persönliche Mitteilungen). Durch Zugabe von höheren DTT-Konzentrationen oder auch β -Mercaptoethanol kann keine erhöhte Stabilität beobachtet werden. Erst ein zusätzliches Entgasen der Puffer mit Helium und anschließendes Übersichten mit Argon, wodurch vermutlich der Sauerstoff aus den Puffern verdrängt wird, erhöhte die Stabilität des Enzyms auf Tage bis Wochen.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zeigt zwischen pH 6,8 und pH 8,8 UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Deshalb wurden die Proteinreinigungen stets in diesem pH-Bereich durchgeführt.

Aus Rattenleber konnte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bis zur Homogenität gereinigt werden (Hinderlich *et al.*, 1997). Nach Zentrifugation des Homogenates wurden cytosolische Proteine aufgrund unterschiedlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase abgetrennt. Dies erfolgte durch Salminsulfatfällung und anschließender FPLC-Chromatographie über eine Phenylsepharose-Säule, eine ATP-Agarose-Säule und eine MonoQ-Säule. Für die Reinigung des Enzyms aus Insektenzellen stellte sich heraus, daß dieses Reinigungsschema keine reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase liefert. Deshalb wurden weitere Säulenkombinationen für die Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen ausprobiert. Bevor auf einige Säulenkombinationen genauer eingegangen wird, sollen die einzelnen verwendeten Säulen genauer vorgestellt werden.

Die Phenylsepharose-Säule trennt Proteine aufgrund unterschiedlicher hydrophober Interaktionen mit dem Säulenmaterial. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen bindet zum überwiegenden Teil an das Säulenmaterial. Jedoch befindet sich ein großer Anteil (30%) auch im Durchlauf, so daß größere Ausbeuteverluste hingenommen werden müssen. Auch durch mehrfaches Auftragen des Durchlaufes können die Ausbeuteverluste nicht verringert werden. Das gebundene Enzym kann mit 35% Ethylenglycol wieder von der Säule eluiert werden. Mit der Phenylsepharose-Säule wird ein guter Reinigungseffekt erzielt.

Proteine können aufgrund der Anzahl und Verteilung geladener Aminosäuren voneinander getrennt werden. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase hat einen isoelektrischen Punkt von 6,9 (Stäsche, 1997). Da das Enzym bei niedrigeren pH-Werten als 6,8 seine Aktivität verliert, erscheint eine Reinigung bei pH-Werten $> 7,5$ als

sinnvoll. Bei diesen pH-Werten sollte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase negativ geladen sein, so daß sich eine Reinigung über einen Anionenaustauscher anbietet. Die MonoQ-Säule bindet die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bei pH 7,5 nahezu komplett. Mit etwa 300 mM NaCl kann die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in einem scharfen Peak wieder eluiert werden. Der Reinigungseffekt der MonoQ-Säule ist sehr gut. Ein Nachteil dieser Säule ist allerdings, daß das mit 300 mM NaCl eluierte Emzym nur mäßig stabil ist. Trotz zügigen Weiterarbeitens müssen Ausbeuteverluste von etwa 15% in 2 h hingenommen werden.

Die Hydroxylapatit-Säule (HAP) ist ein gemischter Ionenaustauscher, dessen maximale Bindungsfähigkeit bei pH 7,0 liegt. In 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, bindet die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sehr gut an die HAP-Säule. Durch Erhöhen der Salzkonzentration auf etwa 60 mM Natriumphosphat (pH 7,0) läßt sich das Enzym in einem relativ scharfen Peak wieder von der Säule eluieren. Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen sind die Reinigungseffekte der HAP-Säule recht gut.

Die ATP-Agarose-Säule, die Blue-Sepharose-Säule und die Red-Sepharose-Säule haben hohe Affinitäten zu ATP-bindenden bzw. generell Nukleotid-bindenden Proteinen. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen bindet an alle Säulen nur zu 20-30%, so daß sich der größte Teil im Durchlauf befindet und somit große Ausbeuteverluste hingenommen werden müssen. Auch durch mehrfaches Auftragen des Durchlaufs können die Ausbeuteverluste nicht verringert werden. Die gebundene UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kann mit etwa 5 mM ATP oder etwa 1,5 M NaCl von den Säulen eluiert werden, wobei der erzielte Reinigungseffekt sehr gut ist. Jedoch ist das eluierte Protein sehr instabil, wodurch weitere größere Verluste hingenommen werden müssen. Dies liegt vermutlich daran, daß diese Chromatographien in Abwesenheit des Stabilisators UDP durchgeführt werden müssen, damit die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase überhaupt an die Säulen bindet.

Die Gelfiltration beruht auf einer Auftrennung nach Proteingrößen. Da die hexamere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 450 kDa ein sehr großes Protein ist, ist der Reinigungseffekt dieser Säulen recht gut. Ausbeuteverluste durch Stabilitätsprobleme der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase treten bei diesen Säulen nicht auf.

Auch eine Fällung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 0,2% Salminsulfat und die anschließende Resuspension des Pellets in 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, zeigen einen deutlichen Reinigungseffekt des in Insektenzellen überexprimierten Enzyms. Jedoch verbleiben dabei bis zu 40% der

UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Pellet und können auch mit anderen Salzkonzentrationen oder bei anderen Temperaturen nicht wieder resuspendiert werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden für die Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen verschiedene Säulen in verschiedenen Kombinationen ausprobiert (Abb. 3.12). Die Säulenkombination MonoQ und Gelfiltration liefert nahezu reines Enzym. Nach einer solchen Reinigung ist die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bei 4 °C über mehrere Wochen stabil. Wird dieser Säulenkombination noch eine ATP-Agarose-Säule angeschlossen, so erhält man hoch reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (Abb. 3.13). Sie ist jedoch so instabil, daß die Epimerase-Aktivität kaum noch detektierbar ist.

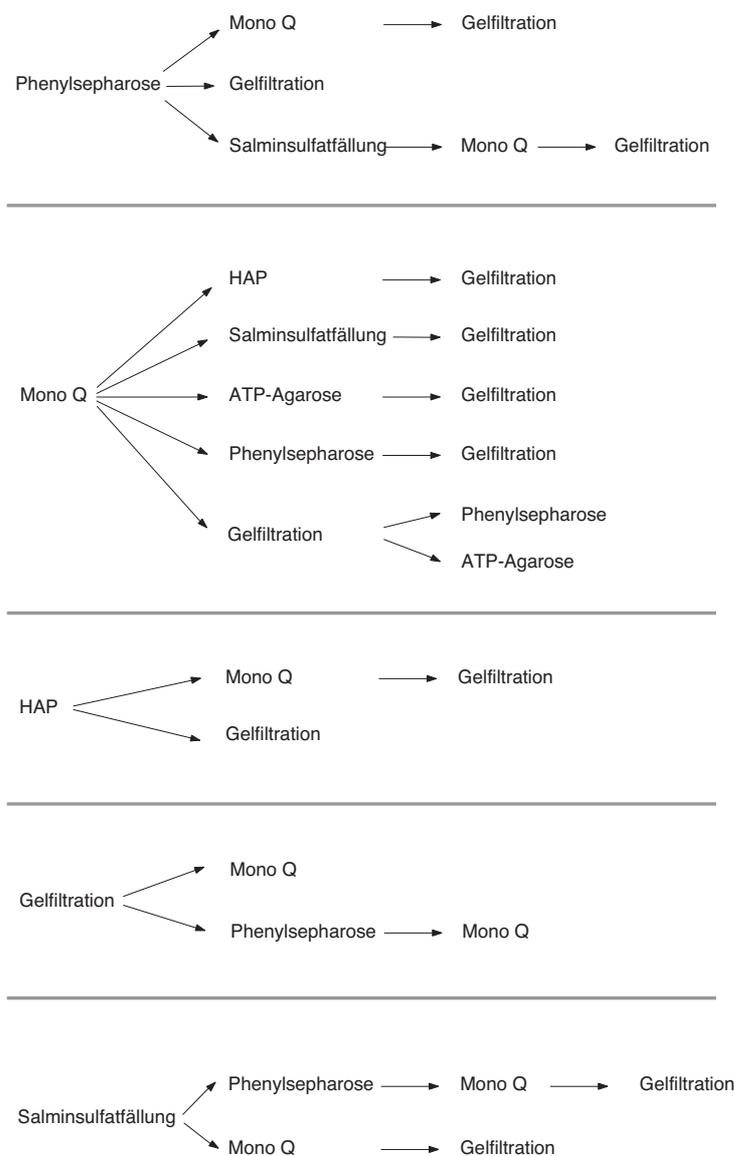


Abbildung 3.12: Verschiedene Säulenkombinationen, die im Rahmen dieser Arbeit für die Reinigung der in Insektenzellen exprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase verwendet wurden.

Nach der Reinigung der in Insektenzellen überexprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine MonoQ- und anschließend eine Gelfiltrationssäule können etwa 4 mg lösliche hexamere epimerase- und kinaseaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus 1 l Insektenkultur isoliert werden. Erfolgt anschließend noch ein weiterer Reinigungsschritt über die ATP-Agarose-Säule, so werden 800 μg Protein aus 1 l Insektenkultur isoliert. Zum Vergleich, nach der Reinigung von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit N-terminalem His- bzw. GST-Tag aus Bakterien werden nur etwa 80 μg Enzym pro Liter Bakterienkultur isoliert.

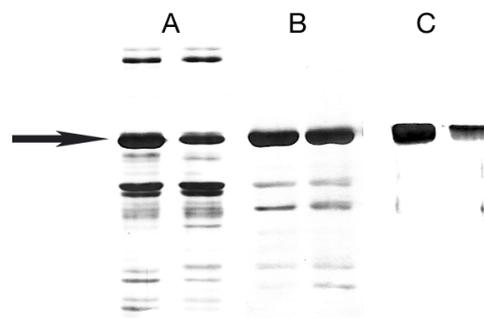


Abbildung 3.13: Silber gefärbte SDS-Polyacrylamidgеле der Fraktionen nach einer MonoQ-, einer Superdex[®]200- und einer ATP-Agarose-Säule.

100 ml Sf-900 II-Insektenzellen wurden für 48-60 h mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei einer MOI von 1 kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Zellen mechanisch mit einer Spritze aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand auf eine MonoQ-Säule aufgetragen. UDP-GlcNAc-2-Epimeraseaktive Fraktionen wurden vereinigt und auf eine Superdex[®]200-Säule aufgetragen. Anschließend wurden UDP-GlcNAc-2-Epimeraseaktive Fraktionen noch über eine ATP-Agarose-Säule gegeben. (A: Fraktionen nach der Auftrennung über die MonoQ-Säule (20 μl); B: Fraktionen nach der Auftrennung über die Superdex[®]200-Säule (20 μl); C: Fraktionen nach der Auftrennung über die ATP-Agarose-Säule (20 μl)). Der Pfeil kennzeichnet die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

Eine weitere geeignete Säulenkombination für die Reinigung des in Insektenzellen exprimierten Proteins stellt die Kombination aus Phenylsepharose-, MonoQ- und Gelfiltrationssäule dar. Nach dieser Reinigung konnte im Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase detektiert werden (Abb. 3.14). Jedoch müssen bei der Reinigung über die Phenylsepharose-Säule größere Ausbeuteverluste hingenommen werden, da etwa 30% des Enzym nicht an die Säulenmatrix bindet. Untersuchungen zur Stabilität des Proteins zeigen, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nach einer solchen Reinigung bei 4 °C über mehrere Tage stabil ist. Die Reinigung der in Insektenzellen überexprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine Phenylsepharose-, eine MonoQ- und anschließend eine Gelfiltrationssäule liefert etwa 3 mg lösliches hexameres epimerase- und kinaseaktives Enzym aus einem Liter Insektenkultur. Bei der Reinigung mittels

MonoQ- und Gelfiltrationssäule konnten 4 mg Protein aus einem Liter Insektenkultur isoliert werden, dafür jedoch nur mit einer Reinheit von 90%.

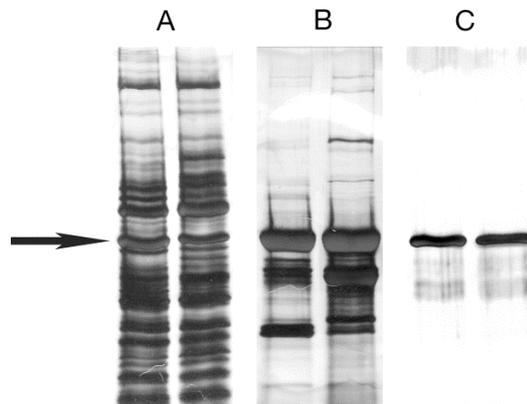


Abbildung 3.14: Silber gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der Fraktionen nach einer Phenylsepharose-, einer MonoQ- und einer Superdex[®]200-Säule.

100 ml Sf-900 II-Insektenzellen wurden für 48-60 h mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei einer MOI von 1 kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Zellen mechanisch mit einer Spritze aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen. UDP-GlcNAc-2-Epimeraseaktive Fraktionen wurden vereinigt und auf eine MonoQ-Säule aufgetragen. Anschließend wurden UDP-GlcNAc-2-Epimeraseaktive Fraktionen noch über eine Superdex[®]200-Säule aufgetrennt. (A: Fraktionen nach der Auftrennung über die Phenylsepharose-Säule (20 μ l); B: Fraktionen nach der Auftrennung über die MonoQ-Säule (20 μ l); C: Fraktionen nach der Auftrennung über die Superdex[®]200-Säule (20 μ l)). Der Pfeil kennzeichnet die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

3.3.3 Reinigung der His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert. Dieser kann bei der Proteinreinigung für eine effektive Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarose-Säule genutzt werden. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bindet gut an die Ni-NTA-Matrix und lässt sich mit 100 mM Imidazol wieder gut als aktives Enzym von der Säule eluieren. So lässt sich eine zu 95% reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isolieren.

Nach der Reinigung der in Insektenzellen überexprimierten His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine Ni-NTA-Agarose-Säule können etwa 30-50 mg lösliche hexamere epimerase- und kinaseaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus einem Liter Insektenkultur isoliert werden. Damit ist die Reinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie eine wesentlich effektivere Reinigung als die Reinigung mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule, denn bei dieser Reinigung können lediglich 4 mg reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase isoliert werden. Im Vergleich zu Bakterien lassen sich aus Insektenzellen etwa fünfhundertmal mehr His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isolieren.

Nach der Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule kommt es zu einem raschen Verlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Dies wird vermutlich durch das Imidazol und/oder Ni²⁺-Ionen, die sich von der Säulenmatrix gelöst haben, verursacht. Zeitler *et al.* (1992) konnten zeigen, daß die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch Schwermetallionen gehemmt wird. Zur Stabilisierung wird die gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nach der Ni-NTA-Agarose-Säule zum Entsalzen noch über eine PD-10-Säule gegeben.

3.3.4 Auflösen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate

Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird stets die Bildung von Protein-Aggregaten beobachtet. Bis zu 70% des überexprimierten Enzyms liegt in solchen Aggregaten vor, die mit pelletiert werden, wenn die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert werden. Wird das Pellet anschließend resuspendiert und erneut zentrifugiert, so bleibt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase weiterhin im Pellet. Erst die Zentrifugation bei geringeren g-Zahlen führt zu einer erhöhten Enzym-Menge im Überstand. Überraschenderweise können im Pellet jedoch nennenswerte Mengen an UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität detektiert werden. Es muß sich also zumindest teilweise um aktives, d.h. richtig gefaltetes und prozessiertes Protein handeln, das aggregiert und anschließend beim Zentrifugieren pelletiert wird. Damit müssen bereits bei diesem Schritt erhebliche Ausbeuteverluste hingenommen werden. Deshalb wurde nochmals versucht, die Aggregate aufzulösen bzw. deren Entstehung zu verhindern.

Um die überexprimierten unlöslichen Proteine in Lösung zu bekommen, wurden die Expressionen zunächst in Sf9- und High Five-Insektenzellen statt Sf-900 II-Insektenzellen durchgeführt. Jedoch konnte auch in diesen Zelllinien keine erhöhte Löslichkeit beobachtet werden. In weiteren Experimenten wurden die infizierten Insektenzellen zu früheren Zeitpunkten geerntet bzw. mit geringeren Virusmengen infiziert, um die Proteinkonzentration möglichst gering zu halten und damit die Neigung zur Bildung von Aggregaten zu verringern. Auch auf diese Weise konnten jedoch keine größeren Proteinmengen als lösliche aktive Form im Überstand detektiert werden. Desweiteren wurde untersucht, ob andere Methoden zum Aufbrechen der Zellen Einfluß auf die Löslichkeit der Proteine haben. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen dem mechanischen Aufbrechen der Zellen mit einer Spritze oder der „French[®] Pressure Cell Press“ und dem Aufbrechen mittels Ultraschall beobachtet werden. Desweiteren wurde versucht, durch Zugabe von GlcNAc oder ManNAc zum Insektenzellkulturmedium die Bildung der Proteinaggregate während der Proteinexpression zu verhindern. GlcNAc und ManNAc zeigen hohe Affinitäten zur

UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, insofern wäre es denkbar, daß sich diese Substanzen an die Bindungsstellen des Enzyms heften und dadurch vermehrt Proteinmoleküle in Lösung bringen. Jedoch konnte auch in diesen Fällen keine verminderte Aggregatbildung beobachtet werden.

Um die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Aggregate aufzulösen, wurden die geernteten mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus infizierten Insektenzellen in Lysepuffer resuspendiert, der mit verschiedenen Reagenzien versetzt wurde (Tab. 3.3). Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen und Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert. Sowohl die Überstände als auch die resuspendierten Pellets wurden auf Enzymaktivitäten untersucht und die Proteinmengen auf SDS-Gelen abgeschätzt. Zunächst wurden Detergenzien zugegeben, um zu überprüfen, ob die Proteine von Lipidhüllen umgeben sind. Dabei wurden unter anderem die nichtionischen Detergenzien Octylglycosid, MEGA-8 und MEGA-10 verwendet, als auch die zwitterionischen Detergenzien CHAPS und Zwittergent sowie das ionische Detergenz Natriumdesoxycholat. Alle Detergenzien wurden bis zu einer Konzentration von 0,2% eingesetzt. Triton, ein starkes nichtionisches Detergenz, wurde bis zu einer Konzentration von 1% eingesetzt. Bei diesen Konzentrationen werden für gewöhnlich Membranproteine solubilisiert. Es zeigte sich, daß keines der Detergenzien die überexprimierten unlöslichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine in Lösung bringen konnte. Daraus läßt sich schließen, daß die überexprimierten unlöslichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine nicht von Membranen umschlossen sind. Auf der anderen Seite lassen sich die Enzyme in einem reduzierenden SDS-Gel als Monomere detektieren, d.h. durch Behandlung mit dem Detergenz SDS zerfallen die Proteinaggregate in Monomere. Dafür sind allerdings SDS-Konzentrationen von mindestens 1% notwendig. Bei derart hohen Konzentrationen können keinerlei Enzymaktivitäten mehr nachgewiesen werden. Jedoch zeigt dieses Ergebnis, daß die Proteinaggregate nicht durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden können, denn sonst könnten im SDS-Gel keine monomeren Proteine detektiert werden, sondern es würden höhere Aggregate beobachtet.

Es konnte also gezeigt werden, daß die Proteinaggregate weder von Membranen noch durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Somit müssen andersartige Wechselwirkungen, wie z.B. hydrophile oder hydrophobe Kräfte, die Unlöslichkeit der Proteine verursachen. Durch Zugabe verschiedener Salze in unterschiedlichen Konzentrationen sollten ionische Wechselwirkungen verringert werden, um so die Proteine in Lösung zu bekommen. Jedoch gelang dieses weder mit 100 mM Na₂SO₄ noch mit 2 M NaCl oder 3 M MgCl₂. Hydrophobe Interaktionen sollten durch Zugabe von bis zu 10% Phenol, n-Butanol, n-Octanol, Aceton, Cyclohexanon, Diethylether, Essigsäureethylester, Pentan, Chloroform oder bis zu 50% Glycerin verringert werden.

Es zeigte sich jedoch, daß keines der Reagenzien die Proteine in Lösung bringen konnte. Um gleichzeitig hydrophile bzw. ionische und hydrophobe Interaktionen zu verringern, wurden 3-Komponentensysteme aus 200 mM bzw. 1 M NaCl in Wasser, einem Alkohol und Chloroform verwendet. Doch führten weder die Mischungen Wasser/Ethanol/Chloroform 10:9:1 und Wasser/Isopropanol/Chloroform 10:10:1 noch Wasser/Butanol/Chloroform 10:1:1 oder Wasser/Aceton/Chloroform 10:9:1 zu einer erhöhten Löslichkeit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Daraus läßt sich schließen, daß die Proteinaggregationen weder durch hydrophile bzw. ionische noch durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden oder daß die Kräfte so stark sind, daß sie durch die verwendeten Reagenzien nicht ausreichend verringert werden, um die Proteine in Lösung zu bringen. Auch Lösungsmittel wie DMSO oder DMF konnten die Proteine nicht in Lösung bringen. Selbst 100 mM DTT, 1% β -Mercaptoethanol, 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 8 M Harnstoff führten nicht zu einer verbesserten Löslichkeit der aggregierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine.

Um Interaktionen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem Cytoskelett auszuschließen, wurden die Insektenzellen mit den Aktin zerstörenden Reagenzien Cytochalasin oder Latrunculin und dem Tubulin zerstörenden Reagenz Colchicin behandelt. Jedoch konnte keines der Reagenzien die Löslichkeit des Proteins erhöhen, so daß Interaktionen mit Aktin und Tubulin als Ursache für die Proteinaggregate ausgeschlossen werden können.

Desweiteren wurde versucht, durch Änderung des pH-Wertes die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Dabei zeigte sich, daß im sauren pH-Bereich Werte von 6 und niedriger die Proteine in Lösung bringen konnten. Jedoch sind unter diesen Bedingungen keine Enzymaktivitäten mehr nachzuweisen. Auch eine kurzzeitige Inkubation der Zellysate unter stark basischen Bedingungen, pH 12, führt zu einer gesteigerten Proteinlöslichkeit. Doch auch diese Bedingungen führen zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivitäten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es zur Zeit keine Möglichkeit gibt die Aggregate der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aufzulösen ohne die Enzymaktivität zu verlieren. Damit verbleibt der überwiegende Teil der überexprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in unlöslichen Aggregaten, was zu hohen Ausbeuteverlusten führt.

Tabelle 3.3: Tabellarische Übersicht getesteter Reagenzien, um die aggregierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine in Lösung zu bringen.

Die geernteten mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus infizierten Insektenzellen wurden mit verschiedenen in Lysepuffer gelösten Reagenzien versetzt, bevor die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen wurden. Nach der Zentrifugation wurden sowohl die Überstände als auch die resuspendierten Pellets auf Enzymaktivitäten untersucht und die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Menge auf einem SDS-Gel abgeschätzt.

Detergenzien	Nichtionisch	Octylglycosid
		MEGA-8
		MEGA-10
		Triton
	Zwitterionisch	CHAPS
		Zwittergent
	Ionisch	Natriumdesoxycholat
		SDS
	Salze	NaSO ₄
NaCl		
MgCl ₂		
Hydrophobe Reagenzien	Glycerin	
	Ethanol	
	Isopropanol	
	Phenol	
	n-Butanol	
	n-Octanol	
	Aceton	
	Cyclohexanon	
	Diethylether	
	Essigsäureethylester	
	Pentan	
	Chloroform	
	Andere Reagenzien	DMSO
DMF		
DTT		
β-Mercaptoethanol		
Guanidiniumhydrochlorid		
Harnstoff		
Cytochalasin		
Latrunculin		
Colchicin		

3.4 Generierung und Charakterisierung von Deletionsmutanten

Durch Generierung verschiedener Punktmutanten in der potentiellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. der ManNAc-Kinase-Domäne des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnte gezeigt werden, daß die N-terminale Epimerase- und die C-terminale Kinasefunktion des Enzyms unabhängig voneinander arbeiten (Effertz et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob sich die beiden Funktionen auch getrennt exprimieren lassen. Dafür wurden Mutanten generiert, die unterschiedlich große Deletionen in der UDP-GlcNAc-2-

Epimerase-Domäne bzw. der ManNAc-Kinase-Domäne aufweisen. Eine getrennte Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und der ManNAc-Kinase-Funktion könnte außerdem eine Stabilisierung der entsprechenden Domäne bewirken.

3.4.1 Generierung der Deletionsmutanten

Die Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im C-terminalen Kinase-Bereich wurden durch Einführen frühzeitiger Stopcodons in der Kinasedomäne generiert. Dies sollte zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese führen und damit zum Verlust der ManNAc-Kinase-Aktivität. Deletionen im N-terminalen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Bereich wurden durch Herausschneiden verschieden großer Fragmente aus dem für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase kodierenden cDNA-Bereich generiert, wodurch die Epimeraseaktivität der resultierenden Proteine verloren gehen sollte.

Das Einführen der Stopcodons in der ManNAc-Kinase-Domäne und der spezifischen Schnittstellen für Restriktionsenzyme in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne erfolgte mittels der QuickChangeTM Site-Directed-Mutagenesis (Abb. 3.15). Bei dieser *in vitro*-Methode werden zur Konstruktion jeder Mutante zwei zueinander revers komplementäre Oligonukleotidprimer benötigt, die die gewünschte Mutation möglichst mittig tragen. Ausgehend von diesen Primern wird doppelsträngige Plasmid-DNA von der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase repliziert. Durch den Einbau der Oligonukleotidprimer wird ein Plasmid generiert, das die gewünschte Mutation enthält. Anschließend wird die parentale Template-DNA durch die Endonuklease *Dpn* I abgebaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA abbaut. Die Vektor-DNA mit der eingeführten Mutation wird anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Mittels der QuickChangeTM Site-Directed-Mutagenesis wurden Stopcodons im ManNAc-Kinase-Bereich eingeführt, wobei der aus *E. coli*-Zellen isolierte pFASTBACHTA-Vektor mit der cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber als Template-DNA diente. Die aus diesen mutierten cDNAs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase resultierenden Proteine sind in Abb. 3.16 dargestellt.

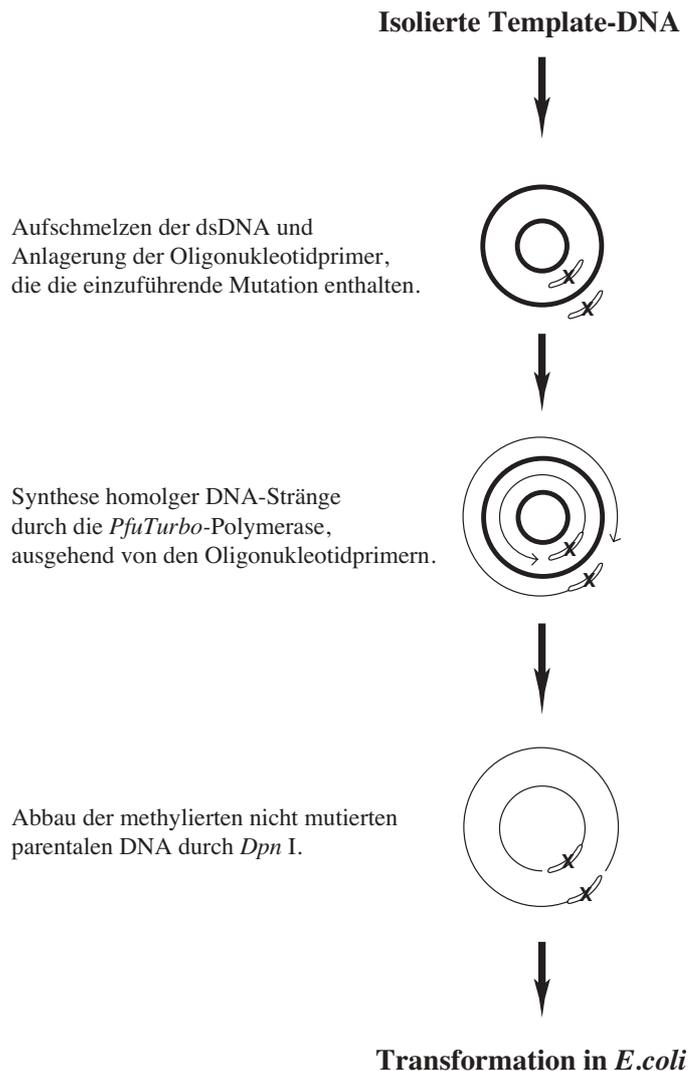


Abbildung 3.15: Prinzip der QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis.

Doppelsträngige Plasmid-DNA wird bei 95 °C denaturiert, so daß sich Oligonukleotidprimer, die die einzuführende Mutation enthalten, 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 circuläre, doppelsträngige DNA mit der eingeführten Mutation wird in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Um aus dem für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase kodierenden Bereich verschiedene Fragmente herauszuschneiden, wurde eine Restriktionsspaltung mit den in den Multiple Cloning Site und nur einmal im UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Bereich schneidenden Restriktionsenzymen *Sst* I bzw. *Nsp* V durchgeführt. Dadurch wurde ein 167 bp bzw. ein 724 bp Fragment aus dem 5'-Bereich der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA herausgeschnitten. Für das Herausschneiden eines weiteren Fragmentes, wurde zunächst mittels QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis an Position 1076 im UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Bereich eine spezifische Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xho* I eingeführt. Auch hier diente der aus *E. coli*-Zellen isolierte pFASTBACHTA-Vektor mit der cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als Template-DNA. Anschließend konnte durch Restriktionsspaltung mit *Xho* I ein

1077 bp Fragment aus dem 5'-Bereich der cDNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase herausgeschnitten werden. Da die Restriktionsspaltungen mit *Sst* I und *Nsp* V zu einer Verschiebung des Leserasters führen, wurde in diesen Fällen in den pFASTBACHTC- bzw. pFASTBACHTB-Vektor umkloniert. Die aus den deletierten cDNAs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase resultierenden Proteine sind in Abb. 3.17 dargestellt.

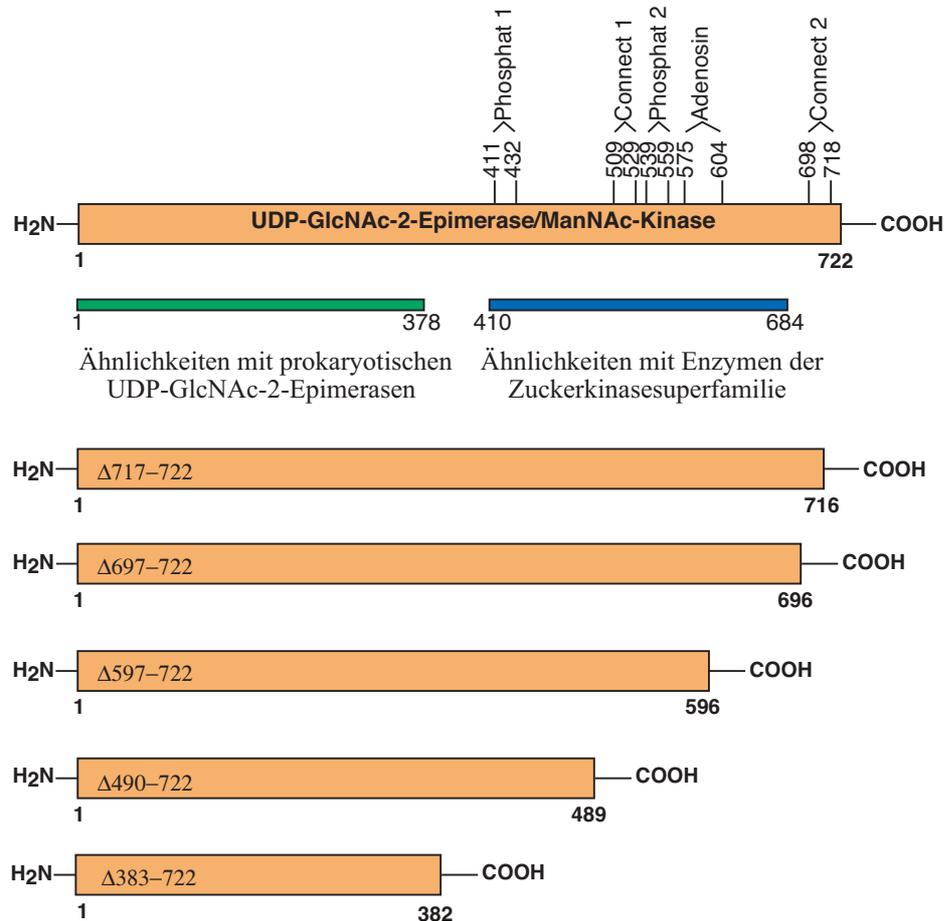


Abbildung 3.16: Resultierende Proteine der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA.

Mittels QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis wurden frühzeitige Stopcodons in die kodierende UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Sequenz eingeführt.

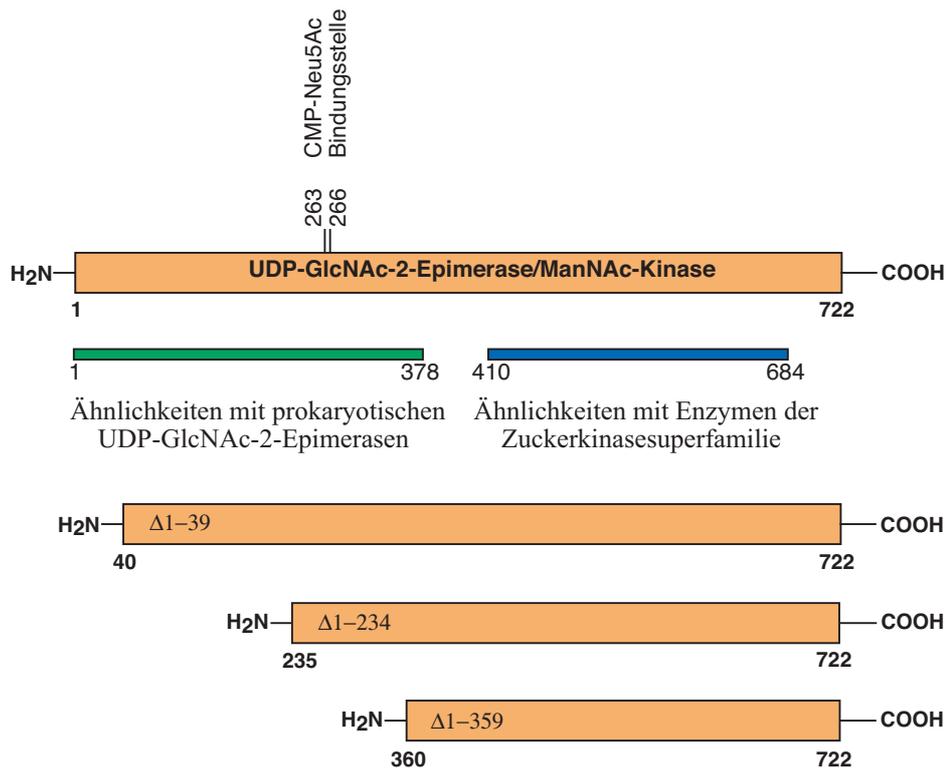


Abbildung 3.17: Resultierende Proteine der deletierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA.

Mittels Restriktionsspaltung wurden verschieden große Fragmente im 5'-Bereich der kodierenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Sequenz herausgeschnitten.

Obwohl die DNA-Amplifikation in der QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis mit der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase durchgeführt wurde, die durch ihre Proof-Reading Funktion eine sechsfach höhere Genauigkeit als die sonst verwendete *Taq*-DNA-Polymerase aufweist, wurde bei allen Konstrukten das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen durchsequenziert, um eventuell aufgetretene Änderungen in der Nukleotidsequenz auszuschließen. Anschließend wurden die Konstrukte in *E. coli* DH10BAC-Zellen transformiert. Die aus diesen Zellen isolierten rekombinanten Bacmide wurden zur Transfektion von Insektenzellen eingesetzt, die nach einigen Tagen rekombinante Baculoviren freisetzen, welche das deletierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthalten. Bevor die Viren zur Infektion eingesetzt wurden, wurden die Mutationen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase cDNA in der jeweiligen Virus-DNA noch einmal nachgewiesen. Dafür wurde zunächst Virus-DNA isoliert, indem durch Inkubation mit Proteinase K die proteinhaltige Virushülle zerstört und die freigesetzte Virus-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt wurde. Das mutierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen wurde anschließend jeweils mit Primern, die etwa 200 bp bzw. 60 bp außerhalb des Gens im Vektor binden, in einer PCR amplifiziert und die Amplifikationsprodukte in einem Agarose-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 3.18). Bei den Mutanten Δ1-39, Δ1-234, und Δ1-359 sind die erwarteten

Fragmentgrößen von 2307 bp, 1749 bp und 1395 bp zu erkennen. Der Wildtyp und die Mutanten, bei denen ein frühzeitiges Stopcodon eingeführt wurde, zeigen Banden bei 2472 bp. Die Anwesenheit der Stopcodons an der richtigen Stelle konnte durch Sequenzierung der PCR-Produkte sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutanten nachgewiesen werden.

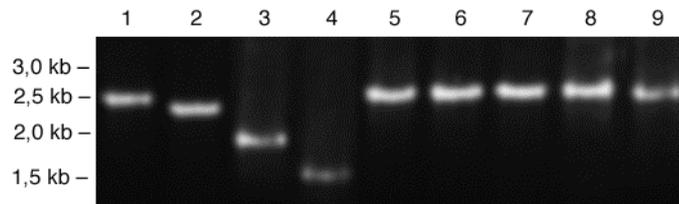


Abbildung 3.18: 1%iges Agarose-Gel nach der PCR von rekombinanter Baculovirus-DNA.

Isolierte Virus-DNA wird in eine PCR eingesetzt, wobei Oligonukleotide als Primer verwendet werden, die Homologien zu Sequenzen etwa 200 bp bzw. 60 bp außerhalb der kodierenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Sequenz zeigen. 5 μ l des PCR-Ansatzes werden auf einem 1%igen Agarose-Gel analysiert (1 – Wildtyp, 2 – Δ 1-39, 3 – Δ 1-234, 4 – Δ 1-359, 5 – Δ 383-722, 6 – Δ 490-722, 7 – Δ 597-722, 8 – Δ 697-722, 9 – Δ 717-722).

Die überprüften rekombinanten Baculoviren wurden amplifiziert und zur Infektion von Sf-900 II-Insektenzellen verwendet. Die geernteten infizierten Insektenzellen wurden anschließend durch Ultraschall aufgebrochen und ein Aliquot auf ein SDS-Gel aufgetragen. Da alle Mutanten mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert werden, konnten die rekombinanten Proteine nach der SDS-PAGE im Western-Blot mit dem His-Tag-spezifischen Antikörper H-15 detektiert werden. Bei allen Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde Protein der erwarteten Größe detektiert (Abb. 3.19).

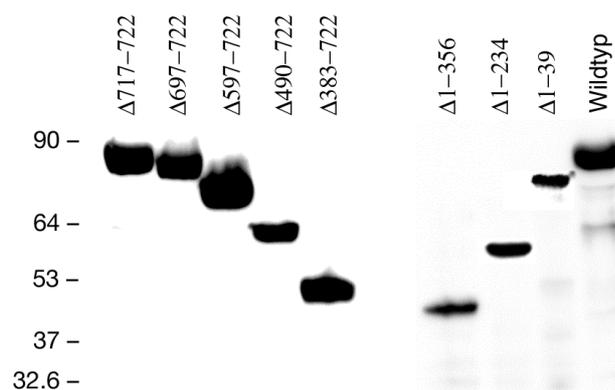


Abbildung 3.19: Western-Blot der in Insektenzellen exprimierten Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

Sf-900 II-Insektenzellen wurden für 48 h bei einer MOI von 3 mit rekombinanten Baculoviren, die das mutierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthalten infiziert. Nach der Zellernte wurden die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen und 20 μ g Gesamtprotein des Lysats mittels Western-Blot analysiert.

Das Molekulargewicht des Wildtypenzym mit His-Tag beträgt 85 kDa. Den N-terminalen Deletionsmutanten fehlen durch Spaltung mit spezifischen Restriktionsenzymen Teile des N-terminalen Bereichs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Der $\Delta 1-39$ -Mutante fehlen die ersten 39 Aminosäuren, so daß das Protein nur eine Größe von 79 kDa hat. Bei der $\Delta 1-234$ -Mutante fehlen die ersten 234 Aminosäuren bzw. bei der $\Delta 1-359$ -Mutante die ersten 359 Aminosäuren, so daß die jeweiligen Proteine nur 58 kDa bzw. 45 kDa groß sind. Den Stopmutanten fehlen durch Einführen eines frühzeitigen Stopcodons Teile des C-terminalen Bereichs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. So fehlen der $\Delta 717-722$ -Mutante die letzten 6 Aminosäuren, das resultierende Protein weist eine Größe von 85 kDa auf. Bei der $\Delta 697-722$ -Mutante fehlen die letzten 26 Aminosäuren, bei der $\Delta 597-722$ -Mutante die letzten 126 Aminosäuren, bei der $\Delta 490-722$ -Mutante die letzten 233 Aminosäuren und bei der $\Delta 383-722$ -Mutante die letzten 340 Aminosäuren, so daß die jeweiligen Proteine nur ein Molekulargewicht von 83, 72, 61 bzw. 49 kDa haben. Damit konnten alle Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit der richtigen Proteingröße in Insektenzellen exprimiert werden.

Für den Wildtyp konnte bereits gezeigt werden, daß nach dem Aufbrechen der infizierten Insektenzellen und anschließender Zentrifugation nur etwa 30-50% des exprimierten Proteins als lösliche Form in den proteinhaltigen Überstand gelangt. Bei den Deletionsmutanten können höchstens 30% des überexprimierten Proteins im proteinhaltigen Überstand nachgewiesen werden, z.T. sind es sogar nur etwa 5%. Daraus kann man folgern, daß durch die eingeführten Deletionen vermutlich Bereiche mit überwiegend hydrophilen Aminosäuren entfernt bzw. destabilisiert wurden, so daß das verbleibende Protein einen hydrophoberen Charakter bekommt und somit unlöslicher wird. Diese Proteine sind dann nur noch in Gegenwart von 1% SDS löslich. Nur für die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren konnte in einem Hydrophobizitäts-Plot gezeigt werden, daß sie einen stark hydrophilen Charakter besitzen.

Von anderen Proteinen ist bekannt, daß durch Coexpression eine erhöhte Löslichkeit der Proteine erzielt werden konnte (Waldo *et al.*, 1999). Deshalb sollte untersucht werden, ob es bei einer gemeinsamen Expression von N- und C-terminalen Deletionsmutanten zu einer Zusammenlagerung der exprimierten Proteine kommt und so zu einer Erhöhung der Löslichkeit. Durch Coinfektion der Insektenzellen mit Viren der N-terminalen Deletionsmutante $\Delta 1-359$ und der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta 490-722$ wurde versucht, die Bildung der Proteinaggregate während der Proteinexpression zu verhindern. Jedoch konnte keine gesteigerte Proteinlöslichkeit nachgewiesen werden.

3.4.2 Enzymatische Aktivitäten der Deletionsmutanten

Um einen ersten Überblick über den Einfluß der Deletionen auf die Enzymaktivitäten zu bekommen, wurden infizierte Insektenzellen lysiert und zunächst in den proteinhaltigen Überständen jeweils die UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivität gemessen. Wie erwartet, zeigt das Wildtypenzym beide Aktivitäten, UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivität. Doch bereits eine Deletion der ersten 39 Aminosäuren führt zu einem kompletten Verlust der Epimeraseaktivität, während die Kinaseaktivität nicht beeinflußt wird. Auch größere Deletionen, fast bis zur kompletten Epimerasedomäne, haben keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität. Daraus kann man folgern, daß es möglich ist, die Kinaseaktivität ohne Funktionsverlust von der Epimerasedomäne zu trennen.

Die C-terminalen Deletionsmutanten, denen die letzten 6, 26 bzw. 126 Aminosäuren durch Einführen eines frühzeitigen Stopcodons fehlen, zeigen sowohl UDP-GlcNAc-2-Epimerase- als auch ManNAc-Kinase-Aktivität. Deletionen von weiteren Aminosäuren führen zu einem kompletten Verlust der Kinaseaktivität, während die Epimeraseaktivität erhalten bleibt. Die $\Delta 383-722$ -Mutante exprimiert nur die ersten 382 Aminosäuren, welche Sequenzhomologien zu prokaryontischen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen aufweisen. Auch diese Mutante zeigt noch Epimeraseaktivität. Damit konnte gezeigt werden, daß auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne funktionell getrennt von der Kinasedomäne exprimiert werden kann.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Deletionen einen Einfluß auf die relativen Enzymaktivitäten haben, d.h. einige Mutanten vielleicht eine verringerte Enzymaktivität zeigen. Da auch die Deletionsmutanten zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate neigen, wäre es denkbar, daß die Deletionsmutanten unterschiedlich viele und große, d.h. lösliche, Proteinaggregate der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bilden, die die gemessenen Enzymaktivitäten stark beeinflussen könnten. Deshalb wurden die proteinhaltigen Überstände sowohl der Mutanten als auch des Wildtyps zunächst über die Gelfiltrationssäule Superdex[®]200 gegeben, um Proteinaggregate der mutierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase abzutrennen. Fraktionen, die Proteine < 600 kDa enthalten, wurden anschließend mit dem radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Assay auf Enzymaktivitäten untersucht. Parallel wurden die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Mengen in den einzelnen Fraktionen in einem Western-Blot mit dem Penta-His-Antikörper detektiert, nachdem die Proteine in den Fraktionen durch Acetonfällung aufkonzentriert wurden. Aus dem Verhältnis von gemessener Enzymaktivität zu ermittelter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Menge wurden die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt. Bezogen auf den Wildtyp ergeben sich daraus relative spezifische Enzymaktivitäten (Abb. 3.20).

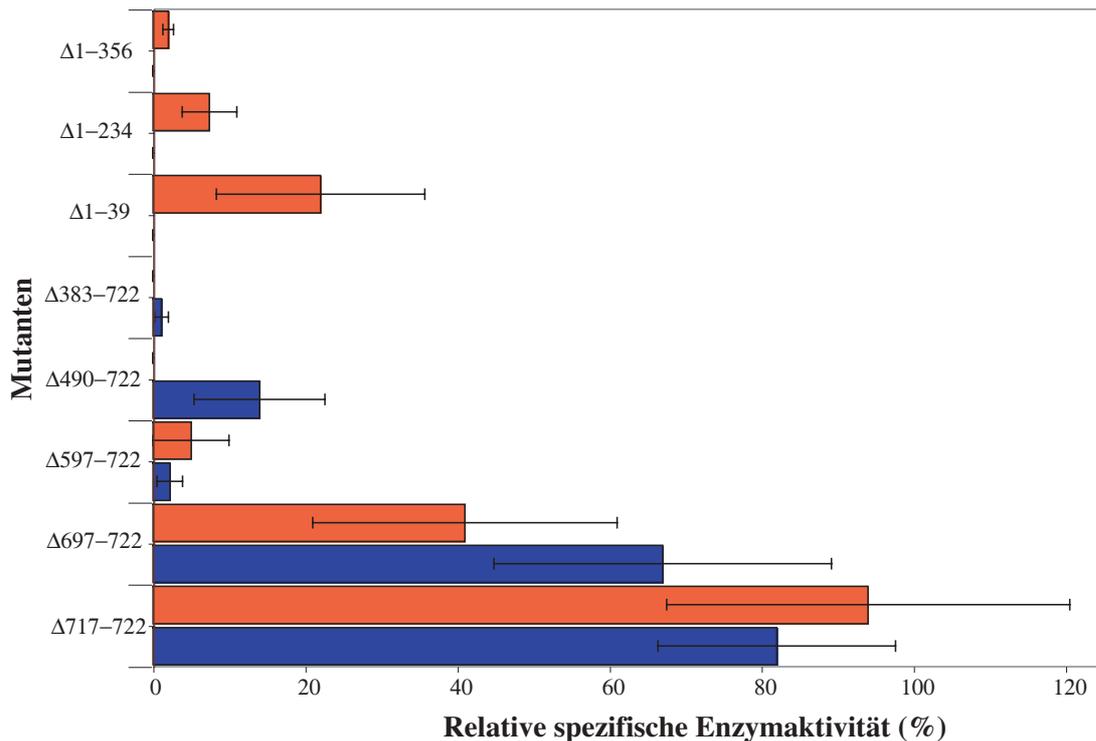


Abbildung 3.20: Relative spezifische Enzymaktivitäten der Deletionsmutanten.

Sf-900 II-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Baculoviren, die das mutierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthalten infiziert. Nach der Zellernte wurden die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand über die Superdex[®]200-Säule gegeben. In den Fraktionen wurden Enzymaktivitäten mittels radioaktivem UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Assay nachgewiesen. Das Restvolumen der Fraktionen wurde durch Acetonfällung aufkonzentriert und die Menge der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Western-Blot mit dem Penta-His-Antikörper ermittelt. Aus dem Verhältnis der gemessenen Enzymaktivitäten zu Menge der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ergibt sich die spezifische Enzymaktivität (Blau – Epimeraseaktivität, Rot – Kinaseaktivität).

Deletionen des N-terminalen Bereichs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase führen zu einem kompletten Verlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Auch die ManNAc-Kinase-Aktivität wird durch diese Deletionen stark verringert. So zeigt die Δ1-39-Mutanten, bei der die ersten 39 Aminosäuren fehlen, gegenüber dem Wildtyp nur noch eine ManNAc-Kinase-Aktivität von 22%. Bei Verlust der ersten 234 Aminosäuren reduziert sich die verbleibende Kinaseaktivität weiter auf 7,5%, bei Verlust der ersten 356 Aminosäuren liegt die detektierbare ManNAc-Kinase-Aktivität unter 5%. Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die ManNAc-Kinase-Aktivität zwar funktionell getrennt von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität exprimieren läßt, aber für die volle Kinaseaktivität Aminosäuren aus der Epimerasedomäne erforderlich sind. Sowohl eine direkte als auch eine indirekte Beteiligung z.B. durch Stabilisierung wichtiger Strukturelemente wäre denkbar. Eine entscheidende Rolle scheint in diesem Hinblick den ersten 39 Aminosäuren zuzukommen, denn bereits ein Verlust dieser ersten Aminosäuren reduziert die ManNAc-Kinase-Aktivität auf 22%.

Das Einführen frühzeitiger Stopcodons führt zu Deletionen des C-terminalen Bereichs der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Durch den Verlust der letzten 6 Aminosäuren wird die ManNAc-Kinase-Aktivität nicht nennenswert beeinflusst. Der Verlust weiterer 20 Aminosäuren jedoch verringert die Kinaseaktivität auf nur noch 40%. Daraus muß gefolgert werden, daß diesen Aminosäuren, d.h. den Aminosäuren 697-716 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, eine wichtige Rolle bei der ManNAc-Kinase-Aktivität zukommt. Eine weitere Deletion des C-terminalen Bereichs führt zu einer weiteren Verringerung der ManNAc-Kinase-Aktivität. Bei Verlust der letzten 126 Aminosäuren können nur noch Kinaseaktivitäten < 5% nachgewiesen werden. Eine weitere Verkürzung des C-terminalen Bereichs führt zu einem kompletten Verlust der ManNAc-Kinase-Aktivität.

Durch das Einführen von Deletionen im C-terminalen Bereich der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird nicht nur die ManNAc-Kinase-Aktivität beeinflusst, sondern auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Der Verlust der letzten 6 bzw. 26 Aminosäuren führt zu einer Reduktion der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität auf etwa 80% bzw. 70%. Ein weiterer Verlust von Aminosäuren reduziert die Epimeraseaktivität auf unter 5%. Damit kann zwar auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität funktionell getrennt von der ManNAc-Kinase-Aktivität exprimiert werden, für die volle UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität sind jedoch noch Aminosäuren aus dem C-terminalen Bereich erforderlich. Eine entscheidende Rolle scheint dabei den Aminosäuren 597-696 zuzukommen, denn ihr Verlust reduziert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität auf Werte nahe der Nachweisgrenze.

Die Mutante $\Delta 490-722$ zeigt im Gegensatz zu den Mutanten $\Delta 597-722$ und $\Delta 383-722$ eine um 10 Prozentpunkte erhöhte UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Vermutlich hat der Verlust der Aminosäuren 490-597 einen positiven Effekt auf die Stabilität bestimmter Strukturen im Enzym, die für die Aktivität erforderlich sind.

3.4.3 Oligomerer Zustand der Deletionsmutanten

Das Einführen einer Deletion in das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Enzym kann neben den Enzymaktivitäten auch den oligomeren Zustand des Proteins beeinflussen. Um den oligomeren Zustand der deletierten Enzyme zu ermitteln, werden die cytosolischen Überstände über die Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule gegeben. In den Fraktionen werden anschließend Enzymaktivitäten gemessen. In Abb. 3.21 und Abb. 3.22 sind diese Enzymaktivitäten für jede Deletionsmutante in einem Diagramm gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen worden. Durch Auftrennung eines Standardproteingemisches können den deletierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/

ManNAc-Kinase-Proteinen native Molekulargewichte zugeordnet werden und so Aussagen über die oligomeren Zustände der Proteine getroffen werden.

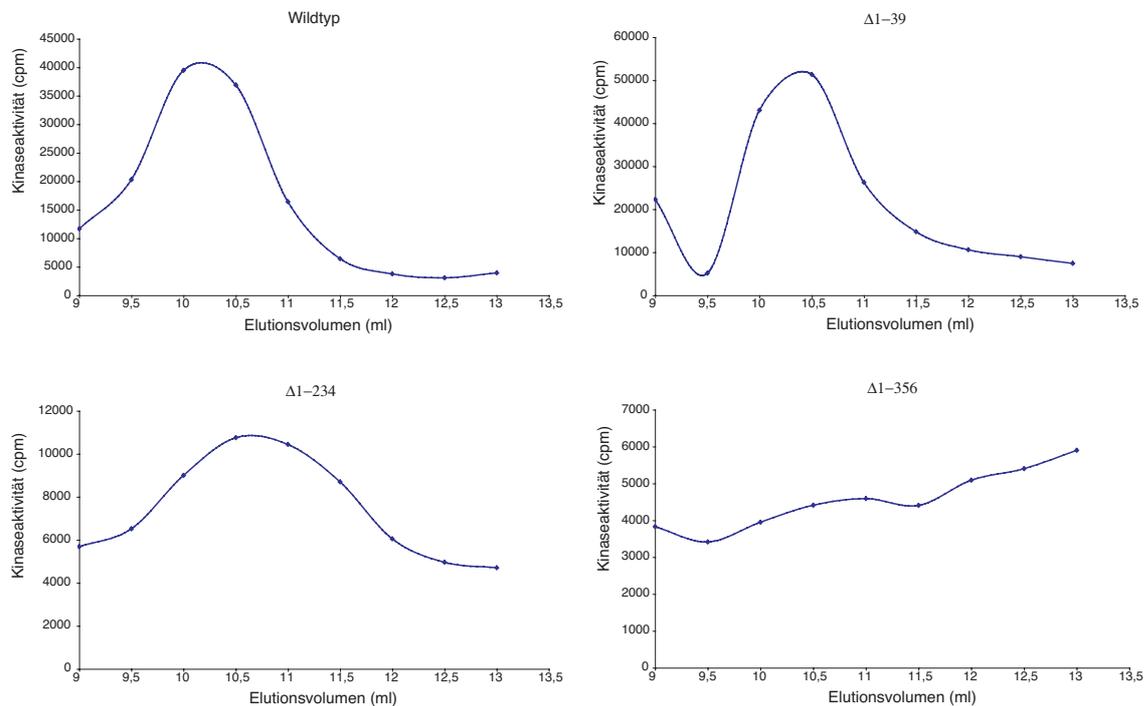


Abbildung 3.21: Ermittlung der oligomeren Zustände der N-terminalen Deletionsmutanten und des Wildtyps.

Sf-900 II-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Baculoviren infiziert, die das Wildtyp- bzw. das mutierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthalten. Nach der Zellernte wurden die Insektenzellen durch Ultraschall aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand über die Superdex[®]200-Säule gegeben. In den Fraktionen wurden Enzymaktivitäten mittels radioaktivem ManNAc-Kinase-Assay nachgewiesen und gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen.

Das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Wildtypenzym wird etwa nach 10,1 ml eluiert, was in Bezug auf den Größenstandard 500 kDa entspricht. Damit liegt das Wildtypenzym wie erwartet als Hexamer vor. Die N-terminalen Deletionsmutanten Δ1-39, Δ1-234 und Δ1-356 werden etwa nach 10,4 ml, 10,6 ml bzw. 11 ml eluiert. Diese Elutionsvolumina entsprechen nativen Molekulargewichten von 390 kDa, 330 kDa bzw. 290 kDa. Somit liegen auch die N-terminalen Deletionsmutanten als Hexamere vor. Die eingefügten Deletionen haben also vermutlich keinen starken Einfluß auf den oligomeren Zustand der mutierten Proteine, d.h. die Aminosäuren 1 bis 356 sind nicht am Oligomerisierungsprozeß der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase beteiligt. Jedoch verbreitert sich der Elutionspeak der deletierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Proteine zunehmend, je größer die eingeführte Deletion ist. Bei der Δ1-356 Mutante sind dann deutlich zwei Peaks zu erkennen, ein Hexamer- und ein kleiner Trimer-Peak.

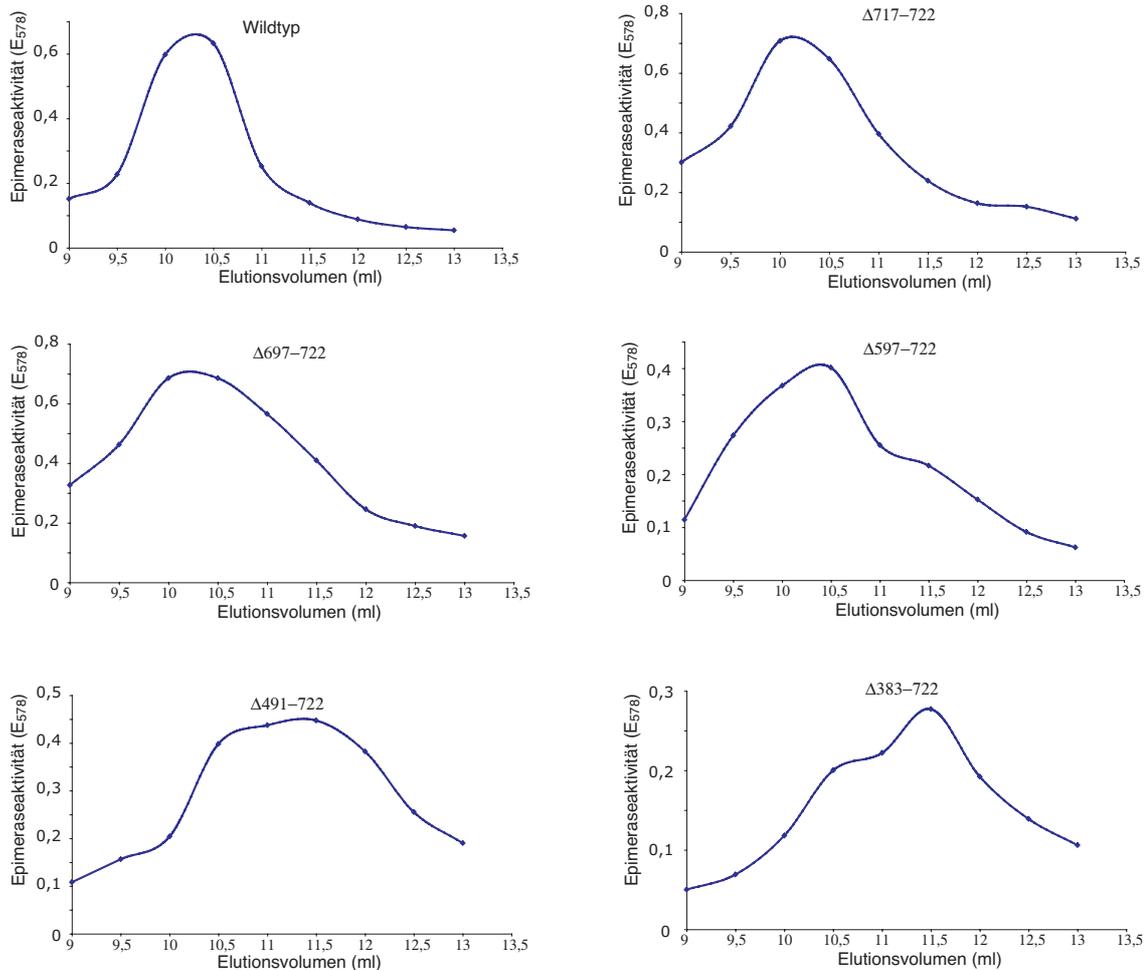


Abbildung 3.22: Ermittlung der oligomeren Zustände der C-terminalen Deletionsmutanten.

Sf-900 II-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Baculoviren infiziert, die das mutierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen enthalten. Nach der Zellernte wurden die Insektenzellen durch Ultraschall aufgebrochen, Zelltrümmer und unlösliche Komponenten abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand über die Superdex[®]200-Säule gegeben. In den Fraktionen wurden UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten mittels Morgan-Elson-Test nachgewiesen und gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen.

Die C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta 717-722$, $\Delta 697-722$ und $\Delta 597-722$ werden etwa nach 10,1 ml, 10,2 ml bzw. 10,3 ml eluiert. In Bezug auf einen Größenstandard entsprechen diese Elutionsvolumina nativen Molekulargewichten von 500 kDa, 480 kDa bzw. 410 kDa. Damit liegen auch diese C-terminalen Deletionsmutanten als Hexamere vor. Die eingefügten Deletionen haben auch hier keinen Einfluß auf den oligomeren Zustand der mutierten Proteine. Jedoch wird bereits bei der $\Delta 597-722$ -Mutante ein kleiner Trimer-Peak sichtbar. Die Mutanten $\Delta 490-722$ und $\Delta 383-722$ werden bei etwa 11,4 ml bzw. 11,5 ml eluiert. Diese Elutionsvolumina entsprechen Molekulargewichten von 220 kDa und 200 kDa. Damit liegen diese beiden Mutanten nicht als Hexamere vor, sondern als Trimere. Bei der $\Delta 490-722$ Mutante ist der Anteil von Hexamer und Trimer in etwa ähnlich groß. Bei der $\Delta 383-722$ Mutante überwiegt

hingegen eindeutig der Anteil der trimeren Strukturen. Durch den Verlust der Aminosäuren 490-597 zerfällt ein großer Anteil der hexameren Strukturen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase also zu Trimeren. Zwischen den Aminosäuren 490-596 müssen demnach Bereiche liegen, die eine entscheidende Rolle bei der Zusammenlagerung der Trimere zu Hexameren spielen, denn bei der Mutante $\Delta 490-722$ ist der Anteil der Trimere bereits geringfügig größer als der hexamere Anteil.

3.4.4 Hemmung der Deletionsmutanten durch CMP-Neu5Ac

Es ist bekannt, daß die Epimeraseaktivität des Wildtypenzym eine starken Feedback-Inhibierung durch CMP-Neu5Ac unterliegt (Kornfel *et al.*, 1964). Deshalb wurden die epimeraseaktiven Deletionsmutanten auf CMP-Neu5Ac-Inhibierbarkeit untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle UDP-GlcNAc-2-Epimerase aktiven Deletionsmutanten durch CMP-Neu5Ac inhibierbar sind (Daten nicht gezeigt). Die Mutante $\Delta 383-722$ exprimiert nur die ersten 382 Aminosäuren des bifunktionellen Enzyms, welche Sequenzhomologien zu prokaryontischen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen aufweisen. Da auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität dieser Mutante noch durch CMP-Neu5Ac inhibierbar ist, muß sich die CMP-Neu5Ac-Bindungsstelle und die für die Inhibierung nötigen Strukturelemente in der Epimerasedomäne befinden. Yarema *et al.* (2001) postulieren eine Beteiligung der Aminosäuren 249-275 an der Ausbildung der CMP-Neu5Ac-Bindungsstelle.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Deletionen einen Einfluß auf die Inhibierung der mutierten Proteine haben, d.h. einige Mutanten vielleicht eine verringerte oder verbesserte Inhibition durch CMP-Neu5Ac zeigen. Dafür wurden für jede Mutante die relativen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten bei verschiedenen CMP-Neu5Ac Konzentrationen bestimmt. Für die Mutanten $\Delta 383-722$ und $\Delta 597-722$ liegen die ermittelten relativen spezifischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten unter 5%, so daß hier keine signifikanten Unterschiede der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten zwischen den verschiedenen CMP-Neu5Ac-Konzentrationen ermittelt werden konnten. Die gemessenen Werte für die anderen Epimeraseaktiven Deletionsmutanten sind in Abb. 3.23 dargestellt. Je größer die eingefügten C-terminalen Deletionen sind, desto stärker sind die resultierenden Proteine durch CMP-Neu5Ac inhibierbar. Bei einer Konzentration von 70 μ M CMP-Neu5Ac läßt sich der Wildtyp beispielsweise nur zu 20% inhibieren, während die $\Delta 490-722$ Mutante zu etwa 70% inhibiert wird. Außerdem folgt die Inhibierung des Wildtyps einer Kurve mit zunehmender negativer Steigung, während die Inhibierung der $\Delta 490-722$ Mutante einer Kurve mit abnehmender negativer Steigung folgt. Daraus muß geschlossen werden, daß sich durch die eingefügten Deletionen nicht nur die Stärke der Inhibierung durch CMP-Neu5Ac ändert, sondern auch die Kinetik. Die Mutanten $\Delta 717-722$ und $\Delta 697-722$

zeigen eine Inhibitionskinetik, die zwischen der des Wildtyps und der von Mutante $\Delta 491-722$ liegt.

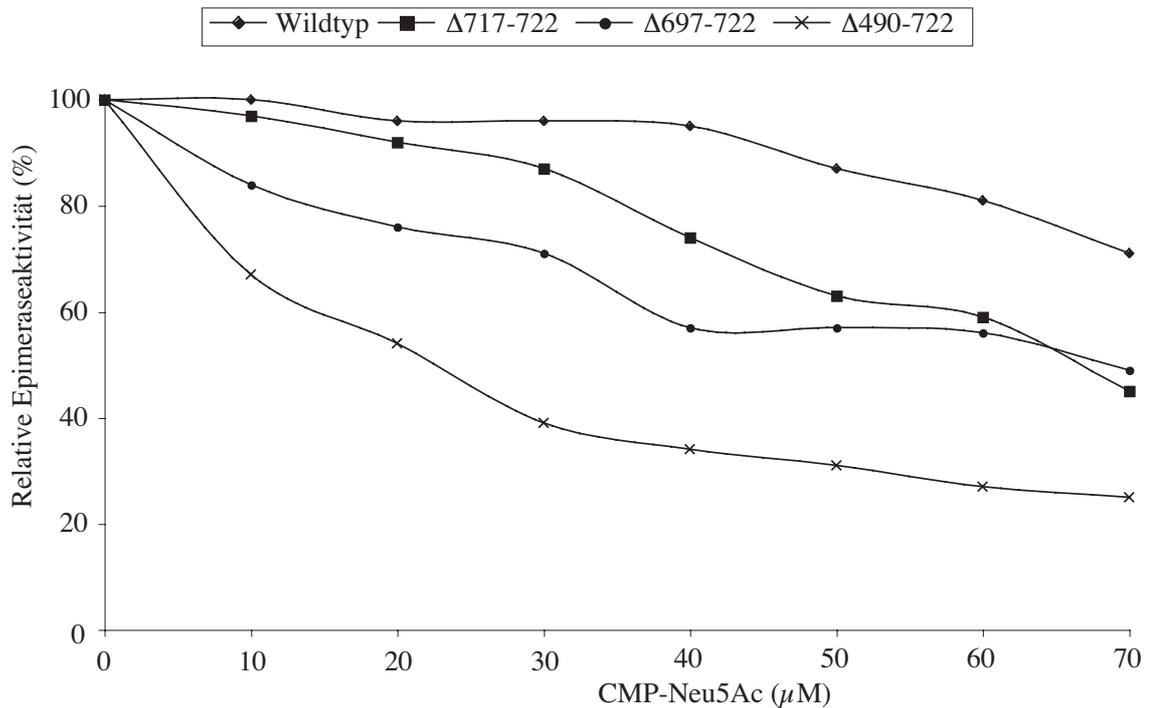


Abbildung 3.23: Relative UDP-GlcNAc-Epimerase-Aktivitäten des Wildtyps und der $\Delta 717-722$ -, $\Delta 697-722$ - und $\Delta 490-722$ -Deletionsmutanten bei Zugabe von verschiedenen CMP-Neu5Ac Konzentrationen.

Die überexprimierten Proteine der Deletionsmutanten und des Wildtyps wurden über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt und jeweils die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten in Anwesenheit verschiedener CMP-Neu5Ac-Konzentrationen mittels radioaktivem UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay bestimmt (Proteinkonzentration jeweils $0,1 \mu\text{M}$).

3.5 Synthese und biochemische Charakterisierung von UDP-GlcNAc-Derivaten als mögliche Enzyminhibitoren

UDP-GlcNAc kann durch Periodat oxidiert werden. Erfolgt diese Oxidation nur mit einem Äquivalent Periodat, so werden selektiv die *cis*-ständigen Hydroxylgruppen am C-2 und C-3 der Ribose zu Aldehyden oxidiert. Die humane Hyaluronat-Synthase ist ein Enzym, das an der inneren Plasmamembran UDP-GlcNAc und UDP-Glucuronsäure auf wachsende Hyaluronat-Ketten überträgt. Dieses Enzym wird durch oxidiertes UDP-GlcNAc (o-UDP-GlcNAc) inhibiert (Pehm, 1985). Auch für die Methylcoenzym M Methylreduktase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, die die Reduktion von Methylcoenzym M zu Methan und Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonsäure) katalysiert, wobei UDP-GlcNAc ein essentieller Cofaktor ist, ist eine Hemmung durch o-UDP-GlcNAc beschrieben worden (Sauer, 1991). Vermutlich bindet der Inhibitor bei beiden Enzymen an die UDP-GlcNAc Bindungsstelle. Deshalb sollte

untersucht werden, ob o-UDP-GlcNAc auch ein Inhibitor für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase darstellt.

3.5.1 Synthese von oxidierten UDP-GlcNAc Derivaten

Für die Synthese von o-UDP-GlcNAc wurde UDP-GlcNAc mit einem Äquivalent Natriummetaperiodat umgesetzt, wodurch die *cis*-ständigen Hydroxylgruppen am C-2 und C-3 der Ribose selektiv zu Aldehyden oxidiert werden (Abb. 3.24). Da es sich bei o-UDP-GlcNAc um einen Dialdehyd handelt, ist es denkbar, daß eine potentielle Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf einer chemischen Reaktion zwischen den reaktiven Aldehydgruppen des Inhibitors und einer Aminosäure, zum Beispiel dem primären Amin eines Lysins, beruht. Deshalb wurden in einem weiteren Syntheseschritt die Aldehydgruppen des o-UDP-GlcNAc durch Natriumborhydrid wieder zu Alkoholen reduziert (r-UDP-GlcNAc; Abb. 3.24).

Es ist zu vermuten, daß o-UDP-GlcNAc im Falle einer Inhibition an die UDP-GlcNAc-Bindungsstelle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bindet. Um die Spezifität des Enzyms genauer zu untersuchen, sollten deshalb weitere oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate getestet werden. Neben kommerziell erhältlichem o-UDP, o-ADP und o-GDP wurden o-Uridin und o-Methylribosid auf ihre mögliche inhibitorische Wirkung untersucht. Für die Synthese von o-Uridin und o-Methylribosid wurden Uridin bzw. Methyl- β -D-ribofuranosid jeweils mit einem Äquivalent Natriummetaperiodat umgesetzt. Analog der Synthese von o-UDP-GlcNAc werden unter diesen Bedingungen selektiv die *cis*-ständigen Hydroxylgruppen am C-2 und C-3 des Riboserings zu Aldehyden oxidiert.

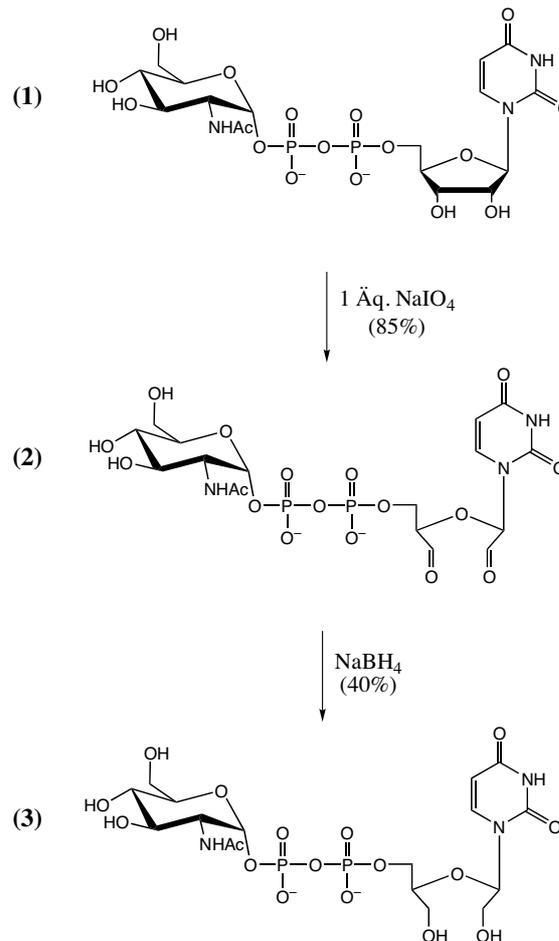


Abbildung 3.24: Struktur und Synthese von oxidiertem UDP-GlcNAc (o-UDP-GlcNAc) und anschließende Reduktion zu r-UDP-GlcNAc.

UDP-GlcNAc wird mit 1 Äquivalent Natriummetaperiodat zu o-UDP-GlcNAc umgesetzt. Die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid liefert r-UDP-GlcNAc.

3.5.2 Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc

Um einen ersten Überblick über die inhibitorische Wirkung von o-UDP-GlcNAc zu erhalten, wurde die gereinigte Substanz mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase inkubiert. Es zeigte sich, daß die Epimeraseaktivität mit mikromolaren Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten von 30 min inhibiert werden konnte, während die Kinaseaktivität kaum beeinträchtigt wurde. Zur weiteren Charakterisierung der Inhibition wurde UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 300 μM o-UDP-GlcNAc in Anwesenheit verschiedener UDP-GlcNAc-Konzentrationen (0,3-2 mM) inkubiert. Je höher die Konzentration des natürlichen Substrates war, desto geringer war die Inhibition der Epimeraseaktivität durch o-UDP-GlcNAc. Daraus läßt sich schließen, daß o-UDP-GlcNAc an das aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet und das Enzym dadurch inhibiert. o-UDP-GlcNAc kann dann entweder als kompetitiver oder als irreversibler Inhibitor der UDP-GlcNAc-2-Epimerase wirken. Um die Art der

Inhibition genauer zu charakterisieren, wurde das Enzym zunächst mit o-UDP-GlcNAc inkubiert und anschließend das natürliche Substrat UDP-GlcNAc zugegeben. Es konnte nach dieser Behandlung jedoch keine Epimeraseaktivität mehr detektiert werden. Dies zeigt, daß o-UDP-GlcNAc ein irreversibler Inhibitor der Epimeraseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist. Vermutlich bindet o-UDP-GlcNAc über seine reaktiven Aldehydgruppen kovalent an Aminosäuren, beispielsweise an die primäre Aminogruppe von Lysinen, im aktiven Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase und blockiert damit die UDP-GlcNAc-Bindungsstelle irreversibel.

Um zu untersuchen, ob die inhibitorische Wirkung von o-UDP-GlcNAc auf der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den reaktiven Aldehydgruppen und Aminosäuren des Enzyms beruht, wurden die Aldehydgruppen des o-UDP-GlcNAc durch Natriumborhydrid wieder zu Alkoholen reduziert (r-UDP-GlcNAc). Bei einer Konzentration von 1,25 mM UDP-GlcNAc zeigte die Inkubation der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 300 μ M o-UDP-GlcNAc bzw. r-UDP-GlcNAc, daß o-UDP-GlcNAc die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität zu 93% inhibiert, während r-UDP-GlcNAc nur zu 16% inhibiert. Das Diol r-UDP-GlcNAc wirkt als kompetitiver Inhibitor, da durch Erhöhung der UDP-GlcNAc-Konzentration die Inhibition wieder aufgehoben werden kann. Im Gegensatz dazu beruht die hohe inhibitorische Wirkung von o-UDP-GlcNAc auf der irreversiblen Bindung an die UDP-GlcNAc-Bindungsstelle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, da sie durch Zugabe von UDP-GlcNAc nicht wieder aufgehoben werden kann.

3.5.3 Charakterisierung der Hemmung der Epimeraseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc Derivate

Erste Versuche zur inhibitorischen Wirkung von o-UDP-GlcNAc hatten gezeigt, daß die Epimeraseaktivität des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit mikromolaren Inhibitorkonzentrationen vollständig inhibiert werden kann. Für die weitere Charakterisierung der Inhibierung wurden die Wirkung von o-UDP-GlcNAc und einiger Periodat-oxidierten Derivate auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht (Abb. 3.25). Alle getesteten Substanzen inhibieren in Abhängigkeit von der Konzentration, wobei von den getesteten Substanzen o-UDP-GlcNAc der effektivste Inhibitor war. Nach 30-minütiger Inkubation inhibieren 50 μ M o-UDP-GlcNAc die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität bereits zu 70%, 250 μ M inhibieren mehr als 90% der Epimeraseaktivität. Damit wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität durch o-UDP-GlcNAc in ähnlichen Konzentrationen inhibiert wie die Hyaluronat-Synthase und die

Methylcoenzym M Methylreduktase. Auch die Nukleotide o-UDP, o-ADP und o-GDP inhibieren die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität sehr gut. 1 mM o-Uridin bzw. o-Methylribosid hingegen inhibiert die Enzymaktivität nur zu etwa 50%.

In weiteren Versuchen wurde die inhibitorische Wirkung der Substanzen auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit getestet (Abb. 3.25). Wieder zeigt o-UDP-GlcNAc die größte inhibitorische Wirkung. o-UDP-GlcNAc inhibiert die Epimeraseaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 300 μ M bereits nach 12 min zu 40%. Auch o-UDP und o-ADP zeigen einen ähnlichen Effekt auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. o-GDP, o-Uridin und o-Methylribosid haben nahezu keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

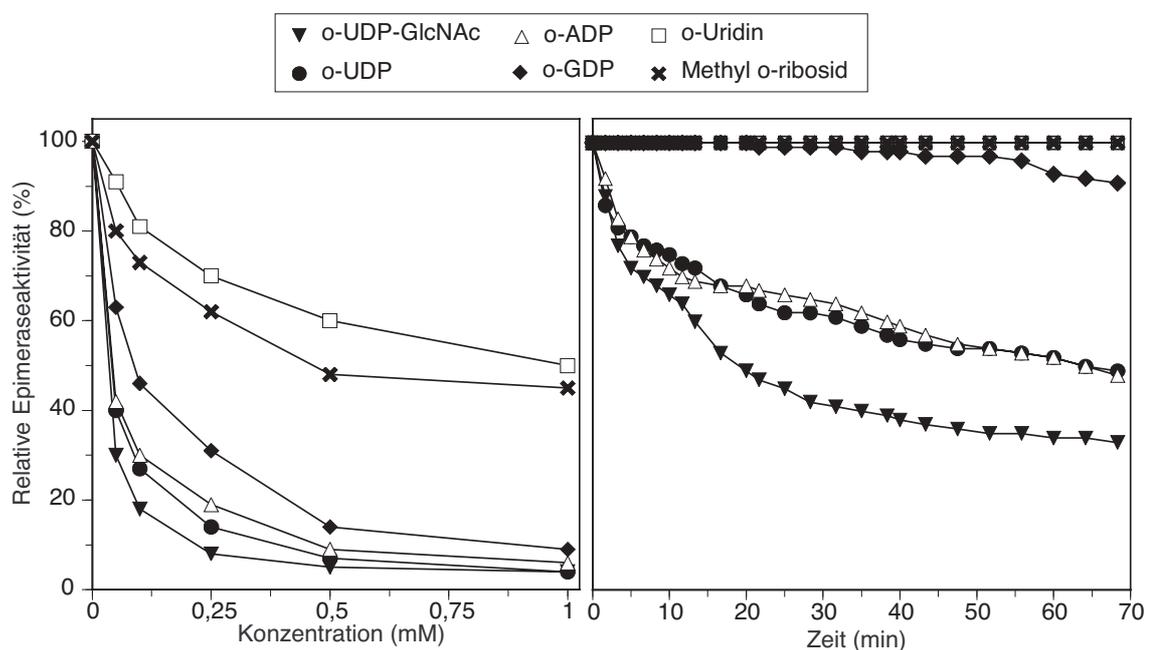


Abbildung 3.25: Konzentrationsabhängige (links) und zeitabhängige (rechts) Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate.

Mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von o-UDP-GlcNAc bzw. Derivaten inkubiert (links) und mittels Morgan-Elson-Test die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt. Für die zeitabhängige Inhibition (rechts) wird mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 300 μ M o-UDP-GlcNAc bzw. Derivaten für verschiedene Zeiten inkubiert. Mittels UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 2 werden die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt. In Bezug auf eine Kontrolle ergeben sich aus den gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten relative UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten.

Die insgesamt niedrigeren Inhibitionswerte bei der zeitabhängigen Hemmung sind durch das verwendete Assay-System begründet. Bei der Messung der zeitabhängigen Inhibition werden neben der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase noch größere Mengen (etwa 40-facher Überschuß) an Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase in den Assay gegeben. Durch unspezifische Reaktionen der reaktiven Aldehydgruppen der Inhibitoren mit Aminosäuren dieser Proteine können

Inhibitormoleküle inaktiviert werden, wodurch die tatsächliche Inhibitorkonzentration nicht mehr bei 300 μM , sondern niedriger liegt.

o-UDP-GlcNAc zeigt die größte strukturelle Verwandtschaft zum natürlichen Substrat UDP-GlcNAc, d.h. es paßt am besten ins aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase und inhibiert deshalb auch am schnellsten. Auch o-UDP und o-ADP binden noch gut im aktiven Zentrum des Enzyms und hemmen die Aktivität deshalb nur geringfügig schlechter als o-UDP-GlcNAc. Für UDP ist bekannt, daß es durch Bindung an das aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase den hexameren Zustand der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase stabilisiert (Hinderlich et al., 1997). o-GDP hingegen scheint schlecht ins aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu passen und ist deshalb ein schlechter Inhibitor. Bei o-Uridin und o-Methylribosid scheint es keinerlei spezifische Wechselwirkungen mit der UDP-GlcNAc-Bindungsstelle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mehr zu geben, so daß diese Substanzen nahezu keine Inhibition zeigen.

3.5.4 Charakterisierung der Hemmung der Kinaseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc und seine Derivate

In den bisherigen Versuchen wurde nur die inhibitorische Wirkung von o-UDP-GlcNAc und seinen Derivaten auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase untersucht. Deshalb sollte nun der Einfluß der Inhibitoren auf die ManNAc-Kinase-Aktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 300 μM in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt werden (Abb. 3.26). Unter diesen Bedingungen konnte nahezu keine Inhibition der ManNAc-Kinase-Aktivität beobachtet werden. Lediglich durch 300 μM o-ADP wird die ManNAc-Kinase-Aktivität nach 1 h-Inkubationszeit zu etwa 20% inhibiert. Daraus läßt sich schließen, daß die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate spezifisch an die UDP-GlcNAc-Bindungsstelle des Enzyms binden, was jedoch die Kinaseaktivität des Enzyms nicht beeinflußt. Es müssen also zwei getrennte unabhängige aktive Zentren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität und die ManNAc-Kinase-Aktivität des bifunktionellen Enzyms existieren.

Da die ManNAc-Kinase-Aktivität nach 1 h-Inkubationszeit durch 300 μM o-ADP zu etwa 20% inhibiert wird, wurde auch für die ManNAc-Kinase eine konzentrationsabhängige Inhibierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate durchgeführt (Abb. 3.26). o-ADP ist der effektivste Inhibitor der ManNAc-Kinase, was aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu ATP eine Bindung an die ATP-Bindungsstelle der Kinase nahelegt. Nach

30-minütiger Inkubation inhibieren 4 mM o-ADP die ManNAc-Kinase-Aktivität zu 70%. Die Inhibition durch die anderen Nukleotide, o-GDP, o-UDP und o-UDP-GlcNAc ist wesentlich schwächer und liegt bei etwa 25%. o-Uridin und o-Methylribosid zeigen nahezu keinerlei inhibitorische Wirkung.

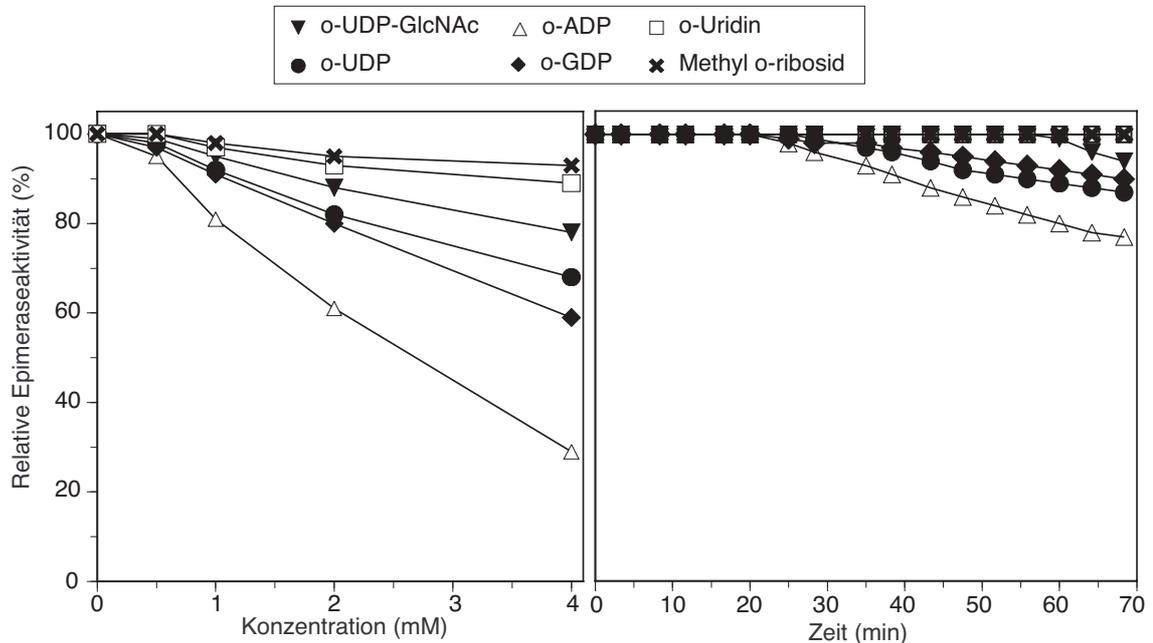


Abbildung 3.26: Konzentrationsabhängige (links) und zeitabhängige (rechts) Hemmung der ManNAc-Kinase-Aktivität durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate.

Mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von o-UDP-GlcNAc bzw. Derivaten inkubiert (links) oder mit 300 μ M o-UDP-GlcNAc bzw. Derivaten für verschiedene Zeiten inkubiert (rechts). Die ManNAc-Kinase-Aktivitäten werden jeweils durch den ManNAc-Kinase-Assay 1 bzw. den ManNAc-Kinase-Assay 2 ermittelt. In Bezug auf eine Kontrolle ergeben sich aus den gemessenen ManNAc-Kinase-Aktivitäten relative ManNAc-Kinase-Aktivitäten.

Die ManNAc-Kinase-Aktivität läßt sich wesentlich schlechter inhibieren als die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Für die Hemmung der ManNAc-Kinase-Aktivität werden etwa 40-fach höhere Inhibitorkonzentrationen benötigt als für die Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Damit sind die Inhibitionen der beiden Enzymaktivitäten zwei unabhängige Ereignisse wobei die entsprechenden Inhibitoren jeweils an die zwei aktiven Zentren des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase binden.

3.5.5 Hemmung der UDP-Gal-4-Epimerase durch o-UDP-GlcNAc und o-UDP

Die UDP-Gal-4-Epimerase ist ein cytosolisches Protein, das durch Epimerisierung in 4-Position UDP-Galactose reversibel in UDP-Glucose umwandelt. Für die UDP-Gal-4-Epimerase aus Säugetieren wird vermutet, daß sie auch die Epimerisierung von UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc katalysiert (Piller, 1983). Deshalb wurde die inhibitorische Wirkung von o-UDP und o-UDP-GlcNAc auf die UDP-Gal-4-Epimerase in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht (Abb. 3.27).

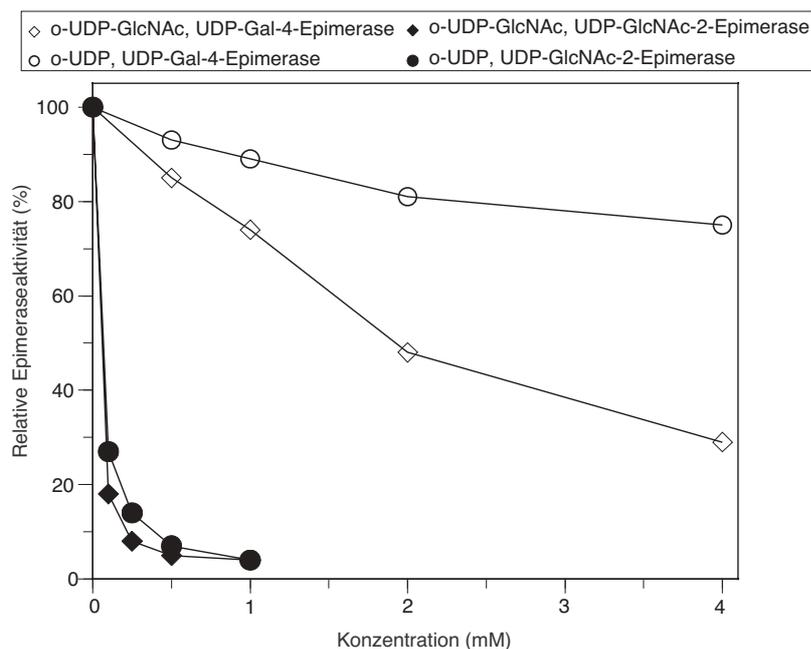


Abbildung 3.27: Inhibierung der Epimeraseaktivität der UDP-Gal-4-Epimerase und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP und o-UDP-GlcNAc in Abhängigkeit von der Konzentration.

UDP-Gal-4-Epimerase und mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurden für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von o-UDP bzw. o-UDP-GlcNAc inkubiert. Die Epimeraseaktivitäten wurden jeweils durch den UDP-Gal-4-Epimerase-Assay bzw. den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 1 ermittelt. In Bezug auf eine Kontrolle ergeben sich aus den gemessenen Enzymaktivitäten relative Enzymaktivitäten.

Sowohl o-UDP, als auch o-UDP-GlcNAc inhibieren die UDP-Gal-4-Epimerase. Jedoch sind für eine 20%ige Inhibition der UDP-Gal-4-Epimerase-Aktivität millimolare Inhibitorkonzentrationen erforderlich, während für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nur mikromolare Konzentrationen benötigt werden. o-UDP und o-UDP-GlcNAc binden also wesentlich besser an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Daraus kann geschlossen werden, daß o-UDP-GlcNAc eine höhere Affinität zur UDP-GlcNAc-2-Epimerase und anderen Enzymen mit einer spezifischen UDP-GlcNAc-Bindungsstelle zeigt als zu Enzymen ohne eine solche spezifische UDP-GlcNAc-Bindungsstelle. Dadurch können mögliche Nebeneffekte

vermieden werden, falls es gelingt, diese Derivate in Zellen einzuschleusen. Die Substanzen könnten dann auch in Zellen als spezifische Inhibitoren wirken.

o-UDP-GlcNAc inhibiert die UDP-Gal-4-Epimerase besser als o-UDP, d.h. UDP-GlcNAc wird vermutlich vom aktiven Zentrum des Enzyms besser erkannt als o-UDP. Dies läßt vermuten, daß bei der Substraterkennung der UDP-Gal-4-Epimerase dem Zuckeranteil im Substrat eine entscheidende Rolle zukommt. Hingegen inhibieren o-UDP und o-UDP-GlcNAc die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase etwa ähnlich gut. Im Gegensatz zur UDP-Galactose-4-Epimerase spielt also vermutlich bei der Substraterkennung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der UDP-Anteil im Substrat die entscheidende Rolle, während dem Zuckeranteil hier eine eher untergeordnete Rolle zufällt. Aus diesem Unterschied bei der Substraterkennung kann man ableiten, daß das aktive Zentrum der beiden Enzyme vermutlich unterschiedlich gestaltet ist und dadurch der Substraterkennung ein unterschiedlicher Mechanismus zugrunde liegt.

3.5.6 Crosslinking der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc

Die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate liegen als Dialdehyde vor. Deshalb wäre es denkbar, daß sie, ähnlich wie von anderen Dialdehyden bekannt, als Crosslinker wirken. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mittels MonoQ- und Superdex[®]200-Säule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bei 37 °C mit 2 mM o-UDP-GlcNAc inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot abgenommen und mittels SDS-PAGE nach Größe, d.h. nach den oligomeren Zuständen, aufgetrennt. Anschließend konnte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in einem Western-Blot mit dem Epimerase-Antiserum nachgewiesen werden (Abb. 3.28).

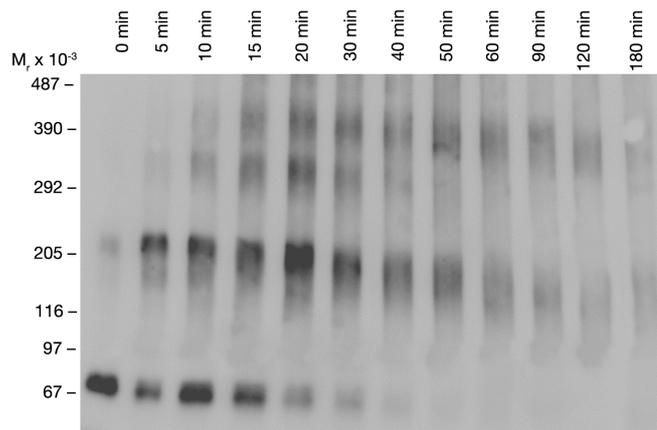


Abbildung 3.28: Western-Blot der Crosslink-Kinetik von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc.

Mittels MonoQ- und Gelfiltrationssäule gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird mit 2 mM o-UDP-GlcNAc inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot abgenommen. 250 ng Protein werden auf ein denaturierendes 4,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteine im Western-Blot mit dem Epimerase-Antiserum nachgewiesen. Als Molekulargewichtsmarker diente quervernetzte Phosphorylase b (Sigma) und „Standard Mixture for Molecular Weights 30000-200000“.

Im Western-Blot ist zu sehen, daß zum Zeitpunkt 0 nur monomere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase von 75 kDa vorliegt. Bereits nach 5-minütiger Inkubation mit o-UDP-GlcNAc wird eine Bande bei 225 kDa sichtbar, was einem Trimer entspricht. Die Intensität dieser Trimer-Bande nimmt mit der Inkubationszeit stetig zu, während die Intensität der Monomer-Bande abnimmt. o-UDP-GlcNAc crosslinkt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase also recht schnell zu einem Trimer. Zum Zeitpunkt 20 min ist die Intensität der Trimer-Bande am stärksten und nimmt mit anhaltender Inkubationszeit wieder ab. Dafür wird bei einer Größe von 450 kDa eine Bande sichtbar, die einem Hexamer entspricht. Die auftretenden Trimer-Strukturen werden also weiter zu Hexameren vernetzt. Zwischen 10 min und 30 min entsteht kurzfristig noch ein Oligomer bei etwa 360 kDa, eventuell ein Pentamer. o-UDP-GlcNAc vernetzt also zunächst die Monomere der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu Trimeren und diese dann weiter zu Hexameren. Die gleichen Ergebnisse konnten mit den Inhibitoren o-UDP und o-ADP erzielt werden.

Der molekulare Shift der Trimer- und Hexamer-Banden mit der Zeit ist durch die vermehrte Anlagerung von negativ geladenen o-UDP-GlcNAc Molekülen an die Proteinoberfläche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu erklären, was in der SDS-PAGE zu einem geringeren apparenten Molekulargewicht führt. Auch Crosslinking der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit dem häufig verwendeten Proteincrosslinker DSS (Disuccinimidylsuberat) führt zunächst zur Bildung von Trimeren und später zu Hexameren. Ein Shift der Molekulargewichte wurde mit diesem ungeladenen Crosslinker jedoch nicht beobachtet.

Um die crosslinkende Wirkung der Inhibitoren auch auf andere Proteine zu untersuchen, wurde neben der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Aldolase mit o-UDP-GlcNAc versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot abgenommen und mittels SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt, d.h. nach den oligomeren Zuständen. Es konnte gezeigt werden, daß auch bei der Aldolase ein Crosslinking stattfand, neben Monomeren wurden später Tetramere, die natürlichen Oligomere der Aldolase, beobachtet. Die o-UDP-GlcNAc Derivate können in entsprechend hohen Konzentrationen also als generelle Crosslinker wirken.

In weiteren Experimenten sollte geprüft werden, ob der Verlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-bzw. ManNAc-Kinase-Aktivität eventuell gar nicht auf einer spezifischen Inhibierung der aktiven Zentren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase beruht, sondern auf der crosslinkenden Wirkung der Inhibitoren. Dafür wurde zu den oben erwähnten Zeitpunkten aus dem Inkubationsansatz mit 2 mM o-UDP-GlcNAc neben einem Aliquot für einen Western-Blot auch ein Aliquot abgenommen, um die verbleibende Enzymaktivität zu diesen Zeitpunkten zu bestimmen. Da die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität bei einer Konzentration von 2 mM o-UDP-GlcNAc bereits nach ein paar Minuten vollständig inhibiert sein sollte, wurde hier die restliche ManNAc-Kinase-Aktivität ermittelt. Dabei zeigte sich, daß bereits nach 15 min nahezu keine Kinaseaktivität mehr detektiert werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt ist im Western-Blot aber noch eine recht starke Monomer-Bande zu erkennen. Daraus läßt sich schließen, daß die Inhibierung der Enzymaktivitäten ein vom Crosslinken unabhängiger Vorgang ist, da die im Western-Blot detektierten Monomere ansonsten noch ManNAc-Kinase-Aktivität zeigen müßten.

Es konnte also gezeigt werden, daß o-UDP-GlcNAc ein guter spezifischer Inhibitor für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist. Bei höheren Inhibitorkonzentrationen wird auch die ManNAc-Kinase-Aktivität gehemmt. Bei noch höheren Inhibitorkonzentrationen wirken sowohl o-UDP-GlcNAc als auch die anderen als Inhibitoren beschriebenen periodatoxydierten Derivate als Crosslinker, d.h. vernetzen die Monomere der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase untereinander.

3.5.7 Wirkung von o-UDP auf CHO-Zellen

Es konnte gezeigt werden, daß am Ribosering zum Dialdehyd oxidierte Derivate des UDP-GlcNAc die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase hemmen. Gleichzeitig haben diese Inhibitoren bei entsprechend höheren Konzentrationen auch crosslinkende Wirkung auf Proteinuntereinheiten, was auf den beiden reaktiven Aldehydgruppen beruht. In Zellkulturversuchen sollte nun untersucht werden, welche Wirkung o-UDP auf Zellen hat und ob es eventuell zu einer Inhibition der UDP-GlcNAc-2-

Epimerase/ManNAc-Kinase in den Zellen kommt. Prehm (1985) konnte zeigen, daß die Hyaluronat-Synthase in B6-Zellen bereits durch eine 15-minütige Inkubation mit 200 μM o-UDP-GlcNAc zu 50% gehemmt wird. Statt der B6-Zellen wurden für die geplanten Versuche in dieser Arbeit adhärente CHO (Chinese-Hamster-Ovary)-Zellen verwendet.

Die CHO-Zellen wurden jeweils mit 0,01 mM, 0,03 mM und 0,1 mM o-UDP bei 37 °C inkubiert und nach bestimmten Inkubationszeiten lichtmikroskopisch auf Veränderungen untersucht. Anschließend wurden die Zellen mit PBS / 0,02% EDTA abgelöst, eventuell aufgetretene morphologische Veränderungen registriert und die Zellen mit Trypanblau angefärbt, um den Anteil toter Zellen zu ermitteln. Als Kontrollen dienten jeweils die Strukturanaloga UDP und Glutardialdehyd in den entsprechenden Konzentrationen.

Es zeigte sich, daß die mit 0,1 mM o-UDP inkubierten Zellen bereits nach 20-minütiger Inkubationszeit etwas angegriffen aussahen. Nach 60 min sind diese Zellen stark gestreckt und glasig und etwa 60% der Zellen sind tot. Bei 0,03 mM o-UDP sind die ersten morphologischen Veränderungen nach 45 min sichtbar und nach 60 min sind etwa 20% der Zellen tot. 0,01 mM o-UDP führt erst nach 60 min zu ersten morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, daß o-UDP in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit zu morphologischen Veränderungen und schließlich zum Tod der Zellen führt.

Je stärker die beobachteten morphologischen Veränderungen der Zellen waren, desto schwieriger ließen sich die Zellen mit PBS / EDTA ablösen. Daraus kann man schließen, daß o-UDP aufgrund seiner beiden Aldehydgruppen die Zellen fixiert und offenbar wie das allgemeine Zellfixierungsreagenz Glutardialdehyd wirkt. Jedoch wirkt Glutardialdehyd noch etwas stärker als o-UDP, so daß die Zellen bei 0,1 mM Glutardialdehyd nach 10 statt 20 min etwas angegriffen aussehen und bereits nach 30-minütiger Inkubationszeit zu 60% tot sind. Mit 0,01 mM Glutardialdehyd werden nach 45 min erste Veränderungen an den Zellen sichtbar. Auf der anderen Seite zeigt UDP nahezu keinerlei Wirkung auf die CHO-Zellen. Nach 30 min Inkubationszeit mit 0,1 mM UDP wird eine geringfügige Streckung der Zellen beobachtet, jedoch sehen die Zellen weiterhin sehr gut aus, und es treten keinerlei Schwierigkeiten beim Ablösen der Zellen auf. Daraus kann geschlossen werden, daß die beobachteten morphologischen Veränderungen der Zellen auf der crosslinkenden Wirkung von o-UDP bzw. Glutardialdehyd beruhen, d.h. auf den äußerst reaktiven Aldehydgruppen dieser beiden Substanzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß o-UDP aufgrund seiner beiden Aldehydgruppen die CHO-Zellen genauso wie Glutardialdehyd fixiert, jedoch etwas

langsamer und schwächer als letzteres. UDP hingegen hat bis 0,1 mM keinen erkennbaren Einfluß auf die Zellen. Prehm (1985) konnte zeigen, daß die Hyaluronat-Synthase in B6-Zellen bereits durch eine 15-minütige Inkubation mit 200 μ M o-UDP-GlcNAc zu 50% gehemmt wird. Da die Hyaluronat-Synthase an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist, muß o-UDP-GlcNAc ins Cytosol der Zellen gelangen, um das Enzym zu inhibieren. Prehm hat bei seinen Versuchen den Anteil toter Zellen nicht bestimmt, im Rahmen dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, daß o-UDP-GlcNAc in diesen Konzentrationen einen erheblichen Anteil der Zellen lysiert bzw. zu starken Zellschädigungen führt. Deshalb ist anzunehmen, daß die starke Inhibition der Hyaluronat-Synthase in den B6-Zellen eher auf sekundären Effekten, z.B. einer eingeleiteten Apoptose und damit beispielsweise der Aktivierung von Proteasen beruht. Auch diese biochemischen Prozesse würden durch einen Proteinabbau zu einer Verringerung der Hyaluronat-Synthase-Aktivität führen.

3.6 Biochemische Charakterisierung von weiteren potentiellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Inhibitoren

Für zahlreiche biochemische und biologische Fragestellungen wäre es sehr hilfreich, wenn Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bzw. die ManNAc-Kinase zur Verfügung stehen würden. Deshalb wurden von Florian Stolz (Universität Konstanz, Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.R. Schmidt) im Rahmen einer Kooperation zahlreiche Substanzen synthetisiert, deren mögliche hemmende Wirkung auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde.

Bei der Epimerisierungsreaktion von UDP-GlcNAc zu ManNAc wird als Zwischenprodukt 2-Acetamidoglucal gebildet. Damit stellen sowohl Analoga des Substrates UDP-GlcNAc als auch des Zwischenproduktes 2-Acetamidoglucal potentielle Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase dar.

3.6.1 Derivate des UDP-GlcNAc als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Der Übergang von UDP-GlcNAc zu 2-Acetamidoglucal sollte über einen Übergangszustand erfolgen, bei dem der Abstand zwischen dem C-1 des Zuckers und dem anomer gebundenen Sauerstoff des UDP-Restes stark vergrößert ist. Deshalb wurden verschiedene Substanzen synthetisiert, bei denen der Zucker über eine CH_2 -Brücke am C-1 mit dem UDP-Rest verknüpft ist. Die CH_2 -Brücke könnte dabei dem Abstand zwischen dem C-1 des Zuckers und dem anomer gebundenen Sauerstoff des UDP-Restes im aktivierten Übergangszustand entsprechen. Zudem ist eine

hydrolytische Abspaltung des UDP-Restes durch das Einführen der CH₂-Brücke nahezu unmöglich geworden. Derartige Inhibitoren würden also, wenn sie ans aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase binden, nicht umgesetzt werden und könnten so das aktive Zentrum des Enzyms wirkungsvoll für das Substrat UDP-GlcNAc blockieren. Auf diesen Überlegungen basieren zahlreiche Verbindungen, z.B. **I1** bis **I5**, aber auch **I7** bis **I10** (Abb. 3.29).

Bei der Umwandlung von UDP-GlcNAc zu ManNAc erfolgt formal eine Anlagerung von Wasser, wobei die Bindung zwischen UDP und dem Zucker gespalten wird. Bei der Epimerisierungsreaktion sollte sich deshalb ein Wassermolekül in räumlicher Nähe zum anomeren C-1 des Zuckers befinden. Diese Überlegungen führten zur Synthese von „Disubstrat“-Analoga, bei denen das hereinkommende Wassermolekül durch OH- bzw. OMe-Gruppen simuliert wurde (**I1**, **I2** und **I4** in Abb. 3.29).

Das Substrat von Sialyltransferasen ist CMP-Neu5Ac - wie UDP-GlcNAc ein nukleotidaktiver Zucker. Inhibitionen der Sialyltransferasen haben gezeigt, daß der abgeflachte Kohlenhydratrest des CMP-Neu5Ac gut durch leichter zugängliche Aromaten und Heterocyclen ersetzt werden kann (Müller et al., 1998). Dieses Prinzip sollte auch für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase untersucht werden. Bei den Verbindungen **I7** bis **I16** ist deshalb der Zucker-Rest durch Aromaten ersetzt worden.

Der Übergang von UDP-GlcNAc zu 2-Acetamidoglucal sollte über einen Übergangszustand erfolgen, bei dem der Abstand zwischen dem C-1 des Zuckers und dem anomeren gebundenen Sauerstoff des UDP-Restes stark vergrößert ist. Wird bei UDP-GlcNAc zwischen dem C-1 des Zuckers und dem UDP-Rest eine CH₂-Brücke eingeführt, so erhält man **I3**; diese Substanz inhibiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu 64%. Bei gleicher Konzentration und gleich guter Bindung von UDP-GlcNAc und **I3** an das Enzym sollte man eine Inhibition von etwa 50% messen. Da die Inhibition mit 64% jedoch größer als 50% ist, läßt sich schließen, daß vermutlich die Bindung von **I3** an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase etwas besser ist als die von UDP-GlcNAc.

Auch bei **I10** und **I12** wurde der Abstand zwischen dem durch einen Aromaten ersetzten Zucker und dem UDP-Rest durch eine CH₂-Gruppe vergrößert. Bei den entsprechenden Phosphonaten **I11** und **I13** wurde der Abstand durch Entfernen des Sauerstoffes zwischen Aromat und UDP-Rest wieder verkürzt. Auch hier zeigt sich, daß ein größerer Abstand zwischen UDP-Rest und Zucker-Anteil zu einer besseren Bindung und damit besseren Inhibition führt. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß durch das Einführen einer CH₂-Brücke zwischen dem C-1 des Zuckers und dem UDP-Rest die Bindung von UDP-GlcNAc an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase verbessert wird.

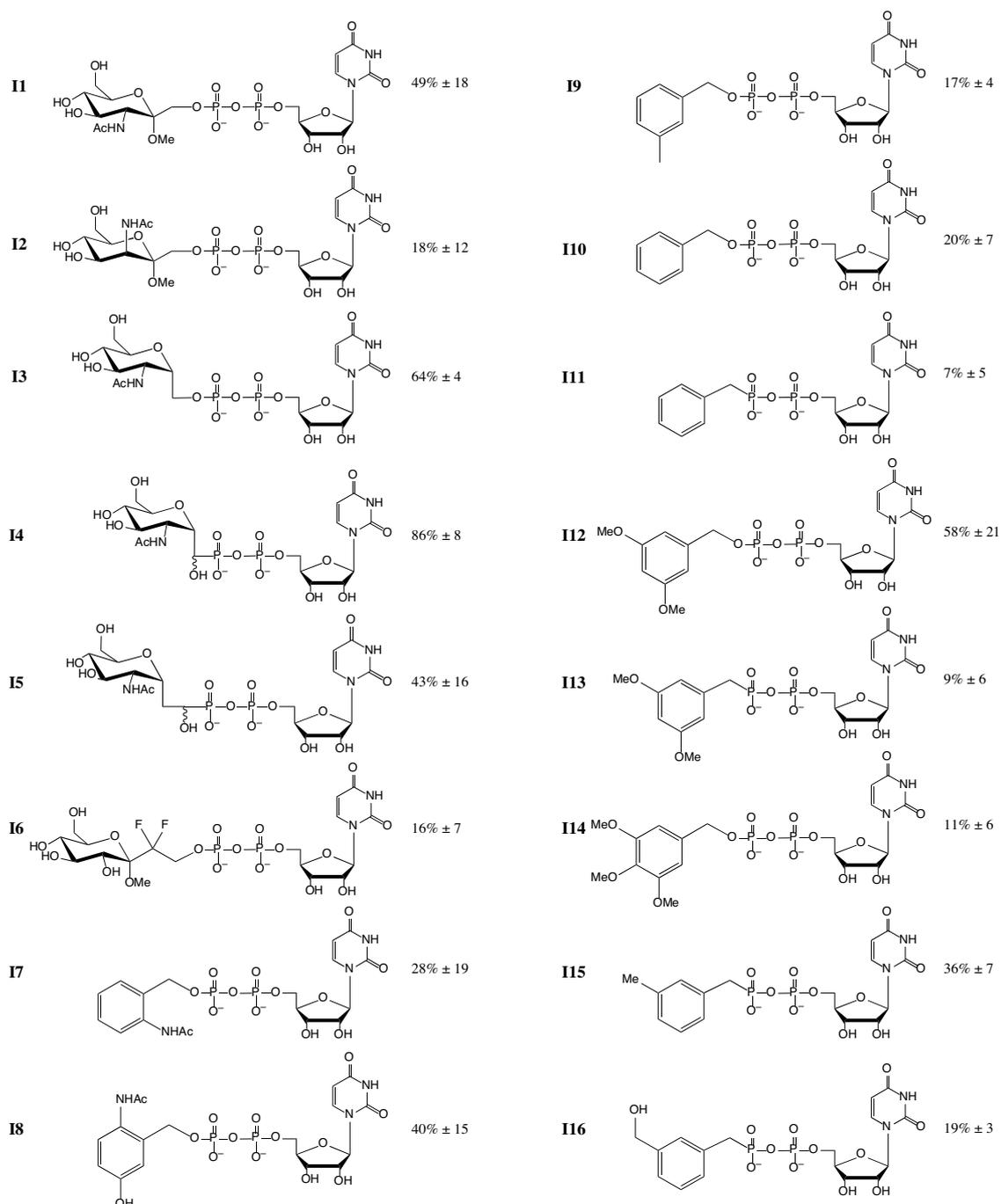


Abbildung 3.29: Struktur und inhibitorische Wirkung von UDP-GlcNAc-Derivaten.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

Bei der Spaltung von UDP und GlcNAc sollte sich ein Wassermolekül in räumlicher Nähe zum anomeren C-1 des Zuckers befinden. Bei **I1** und **I2** wird dieses hereinkommende Wassermolekül durch eine OMe-Gruppe am C-1 des Zuckers simuliert. **I1** stellt dabei die *gluco*-Form dar, während **I2** die *manno*-Form darstellt. **I1** zeigt mit etwa 50% eine bessere Inhibition als die *manno*-Form **I2**. Dies beruht

vermutlich dadrauf, daß die *gluco*-Form **I1** dem erwarteten Übergangszustand von UDP-GlcNAc bei der Abspaltung von UDP näher kommt als die *manno*-Form **I2**.

Auch **I4** stellt ein derartiges „Disubstrat“-Analogon dar. Jedoch ist das hereinkommende Wassermolekül in diesem Fall durch eine OH-Gruppe am Kohlenstoff zwischen dem C-1 des Zuckers und dem UDP-Rest simuliert. Diese Substanz stellt einen sehr guten Inhibitor dar; sie inhibiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu 86%. Damit sind „Disubstrat“-Analoge mit einer polaren Gruppe in räumlicher Nähe zum anomeren C-1 des Zuckers gute Leitstrukturen für Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase.

Mit weiteren Verbindungen sollte untersucht werden, ob der Zuckeranteil im UDP-GlcNAc-Molekül durch leichter zugängliche Aromaten ersetzbar ist. Es zeigte sich, daß auch diese Substanzen als Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase wirken, d.h. an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase binden. Wird der Zucker durch einen Aromaten ersetzt, so hemmen die resultierenden Substanzen die Enzymaktivität nur zu etwa 20%. Die inhibitorische Wirkung wird jedoch durch Art und Position von Substituenten am Aromaten stark beeinflusst. Das Einführen einer NHAc-Gruppe in *ortho*-Stellung führt zu einer Hemmung von 28%. Wird zusätzlich eine OH-Gruppe in der gegenüberliegenden *meta*-Stellung eingeführt, so erhöht sich die Inhibition auf etwa 40%. Das Einführen zweier OMe-Gruppen in *meta*-Stellung führt zu einer Hemmung von knapp 60%. OMe-Gruppen in anderen Positionen oder auch das Einführen einer Me-Gruppe bzw. einer Hydroxymethyl-Gruppe führt zu einer Enzyminhibition von höchstens 35%. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Zucker-Anteil im UDP-GlcNAc gut durch Aromaten ersetzbar ist, jedoch kann gegenüber dem natürlichen Substrat UDP-GlcNAc nur eine geringfügig bessere Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase detektiert werden.

Die getesteten Analoga des UDP-GlcNAc haben gezeigt, daß der Zuckeranteil des UDP-GlcNAc gut durch leichter zugängliche Aromaten ersetzt werden kann, eine CH₂-Brücke zwischen anomerem C-1 des Zuckers und UDP-Rest zur Vergrößerung des Abstandes vorteilhaft ist und eine OH-Gruppe in räumlicher Nähe zum anomeren C-1 die Bindung und damit die Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase entscheidend verbessert. Damit sollte eine Struktur wie **I5** eine sehr gute Inhibition zeigen. Diese Verbindung hemmt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase überraschenderweise jedoch nur zu 43%. Dies zeigt, daß noch andere Effekte, wie beispielsweise geometrische und sterische Effekte, einen starken Einfluß auf die Inhibierung haben. Da **I5** die UDP-GlcNAc-2-Epimerase nennenswert hemmt, kann jedoch gefolgert werden, daß sich die Modellvorstellungen für einen guten Inhibitor bestätigt haben, das Modell allerdings noch weiter modifiziert werden muß.

3.6.2 Derivate des 2-Acetamidoglucals als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Die Anlagerung von Wasser an das Zwischenprodukt der Epimerasereaktion, das 2-Acetamidoglucal, erfolgt vermutlich durch Protonierung des 2-Acetamidoglucals an der 2-Position unter Bildung des 2-Acetamido-2-desoxy-mannosylkations und anschließender *syn*-Addition von Wasser, gefolgt von einer H⁺-Abspaltung. Für diesen Reaktionsschritt wirken sich eine hohe Elektronendichte am C-2 und Planarität im Bereich C-1–C-2 begünstigend aus. Auf dieser Basis wurden zunächst drei Analoga des intermediär gebildeten 2-Acetamidoglucals synthetisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung getestet (Abb. 3.30). Bei **I17** wird durch Einführen einer Ketogruppe am C-3 Planarität im Bereich C-1–C-2–C-3 erreicht, wodurch die Protonierung in der C-2-Position begünstigt werden sollte. Durch Carboxylierung des C-1 wird eine Änderung der Elektronendichte am C-1 und C-2 erreicht (**I18**). Auch das Einführen eines Oxazolrings am C-1 und C-2 führt zu der geforderten Planarität am C-2 und gleichzeitig hoher Elektronendichte an dieser Position (**I19**). **I17** und **I19** zeigen jedoch auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nur eine geringe inhibitorische Wirkung. Bei Zugabe von gleichen Konzentrationen von Substrat und Inhibitor (1,25 mM) konnte gegenüber einer Kontrolle nur eine Inhibition von etwa 20% gemessen werden. Die Substanzen binden an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase und verringern dadurch den Umsatz des Substrates UDP-GlcNAc. Vermutlich binden die Substanzen ans aktive Zentrum, jedoch wesentlich schlechter als das Substrat UDP-GlcNAc, sie sind also schwache kompetitive Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Eine Inhibition der ManNAc-Kinase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

I18 inhibiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu 62%. Diese, im Vergleich zu **I17** und **I19** wesentlich stärkere Inhibition ist vermutlich auf die Carboxylgruppe im Molekül zurückzuführen. Mit dem Einführen dieser Gruppe erhält das Molekül eine negative Ladung. Durch die Inhibitionsversuche mit oxidierten UDP-GlcNAc-Derivaten konnte bereits gezeigt werden, daß den beiden negativ geladenen Phosphatgruppen bei der Bindung an den UDP-GlcNAc-2-Epimerase eine entscheidende Rolle zukommt. Deshalb bindet **I18** mit einer negativen Ladung wesentlich besser an das Enzym und inhibiert dieses dadurch auch stärker als **I17** und **I19**.

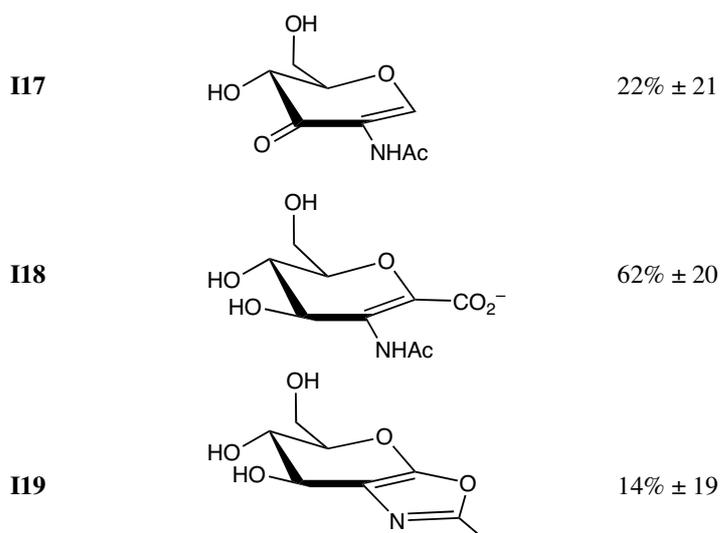


Abbildung 3.30: Struktur und inhibitorische Wirkung von 2-Acetamidoglucal-Derivaten.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

3.6.3 Analoga des Übergangszustandes als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Bei der Bildung des 2-Acetamidoglucals erfordert die Aktivierung von UDP-GlcNAc vermutlich den höchsten Energieaufwand. Deshalb ist anzunehmen, daß ein Acetamidoglucal-UDP-Komplex eine besonders gute Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zeigt. Auf dieser Basis wurden die Verbindungen **I20-I24** synthetisiert (Abb. 3.31).

Abgesehen von **I24** inhibieren alle Verbindungen die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität zu knapp 50%, sie binden also vermutlich ähnlich gut wie das Substrat UDP-GlcNAc. Die *manno*-Form **I22** hemmt die Enzymaktivität offensichtlich etwas schlechter als die *gluco*-Form **I23**. Diese Beobachtung auch bei den UDP-GlcNAc-Derivaten **I1** und **I2** gemacht - die *gluco*-Form inhibiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase etwa 30 Prozentpunkte besser als die *manno*-Form. Desweiteren zeigen diese Verbindungen, daß die NHAc-Gruppe gut durch eine OH-Gruppe ersetzt werden kann. Die Inhibition, d.h. die Bindung an das Enzym, wird durch einen derartigen Austausch nicht negativ beeinflusst. Hingegen zeigt die Verbindng **I24**, ein C-4-Epimer, nur eine Hemmung der Enzymaktivität von knapp 20%. Die Konfiguration am C-4 hat demnach einen entscheidenden Einfluß auf die Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase.

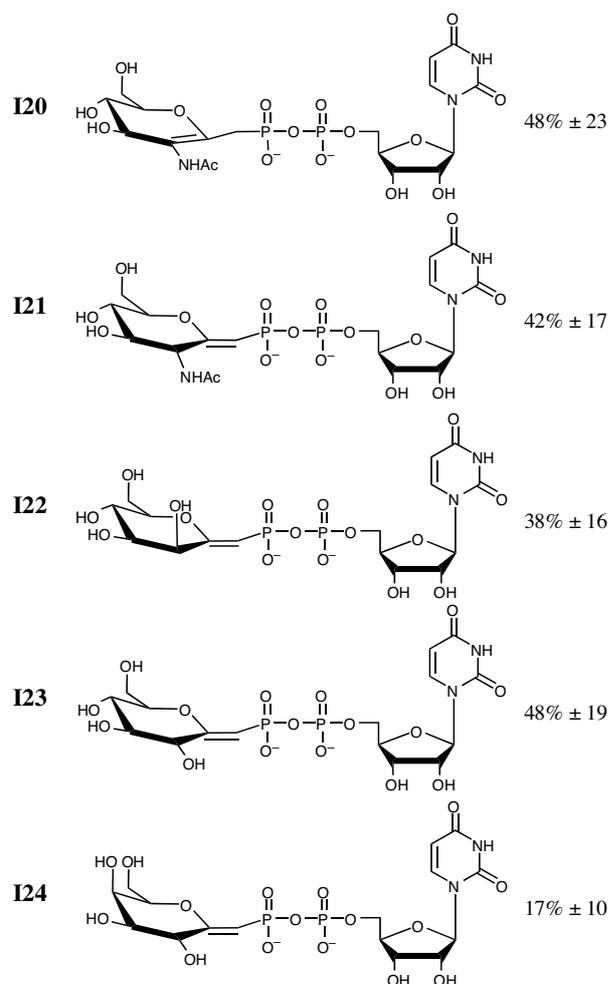


Abbildung 3.31: Struktur und inhibitorische Wirkung von Analoga des Übergangszustandes.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

3.6.4 Derivate der CMP-Neu5Ac als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Die Feedback-Inhibierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch das Endprodukt der *N*-Acetylneuraminsäurebiosynthese CMP-Neu5Ac eröffnet einen weiteren Weg zur Synthese potentieller Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Hydrolysestabile Strukturanaloga von CMP-Neu5Ac mit hoher Affinität zum Protein sollten gute Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität sein.

Sialyltransferasen übertragen Neu5Ac auf verschiedene Glycokonjugate, wobei ihnen CMP-Neu5Ac als Sialyldonor dient. In der Arbeitsgruppe Schmidt/Universität Konstanz sind zahlreiche Derivate der CMP-Neu5Ac als effiziente Inhibitoren von Sialyltransferasen synthetisiert worden. Einige dieser Substanzen wurden an der

UDP-GlcNAc-2-Epimerase getestet, um einen ersten Überblick über die hemmende Wirkung derartiger CMP-Neu5Ac-Derivate auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität zu erhalten (Abb. 3.32).

Auch CMP-Neu5Ac-Derivate inhibieren die UDP-GlcNAc-2-Epimerase recht gut, so hemmen **I27** und **I28** die Enzymaktivität zu knapp 50%. **I26** zeigt sogar eine Inhibition von 63%. **I25** hingegen führt nur zu einer Hemmung von 24%. Diese Unterschiede in den Inhibitionen sind durch die großen strukturellen Unterschiede der „Zucker-Reste“ am CMP begründet. Jedoch kann festgehalten werden, daß auch CMP-Neu5Ac-Derivate die UDP-GlcNAc-2-Epimerase hemmen. Im Vergleich zu dem natürlichen Inhibitor CMP-Neu5Ac sind diese Inhibitionen jedoch nur sehr schwach, denn CMP-Neu5Ac hemmt die Enzymaktivität unter diesen Bedingungen zu mehr als 95%.

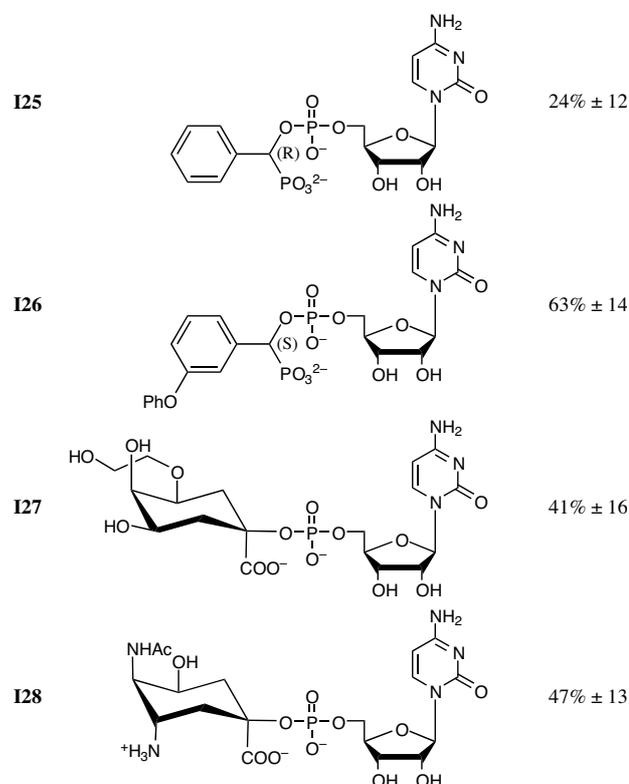


Abbildung 3.32: Struktur und inhibitorische Wirkung von CMP-Neu5Ac-Derivaten.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

3.6.5 UMP-Derivate als mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Bei einer weiteren Gruppe von potentiellen Inhibitoren wurde die β -Phosphatgruppe durch eine Phosphonat-Gruppe ersetzt, wobei die Verknüpfung über die Hydroxylgruppe des α -Hydroxyphosphonats zu einer Geometrieänderung führt. Durch diese Geometrieänderung entsteht eine Struktur, die einem postulierten Übergangszustand näher kommt, bei dem die β -Phosphatgruppe etwas nach oben bzw. unten aus der Bindungsebene herausgedreht ist. Die resultierenden Verbindungen mit der eingeführten Verzweigung ähneln so der Abgangsgruppe UDP. Außerdem führt diese Verzweigung zu einer Geometrie, die der im CMP-Neu5Ac-Molekül ähnelt, wobei die Phosphonatgruppe dann der Carboxylgruppe des CMP-Neu5Ac entspricht.

Das sehr gut an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindende UDP ist ein Molekül mit drei negativen Ladungen. Durch die Phosphonatgruppen wird eine weitere Ladung in die UDP-GlcNAc-Derivate eingeführt.

Wird die β -Phosphatgruppe von UDP-GlcNAc durch eine Phosphonatgruppe ersetzt, so erhält man **I32** (Abb. 3.33). Diese Verbindung inhibiert die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu knapp 90%. **I32** bindet damit vermutlich wesentlich besser an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase als das natürliche Substrat UDP-GlcNAc. Das Austauschen der β -Phosphatgruppe gegen eine Phosphonatgruppe führt zu einer Geometrieänderung und zu einer weiteren negativen Ladung im Molekül, was offenbar eine stärkere Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase begünstigt. Wird eine zusätzliche CH_2 -Gruppe zwischen anomeren C-1 des Zuckers und dem „UDP-Rest“ eingeführt, so reduziert sich die Inhibition von knapp 90% auf 16%. Auch der Austausch des Zuckers durch einen Aromaten mit einer *ortho*- bzw. *para*-ständigen NHAc-Gruppe reduziert die Inhibition auf nur etwa 10% bzw. 40%.

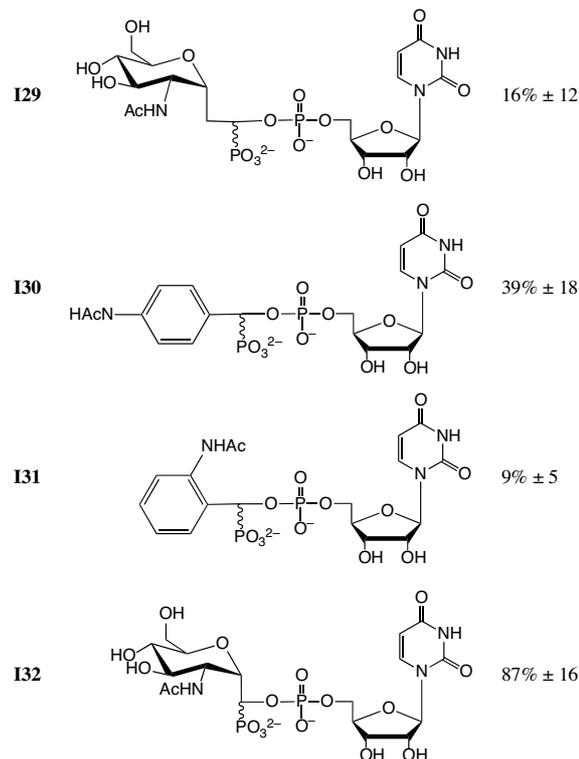


Abbildung 3.33: Struktur und inhibitorische Wirkung von UMP-Derivaten.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

3.6.6 Nikkomycin Z als möglicher Inhibitor der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Nikkomycin Z (**I33**; Abb. 3.34) ist ein Antibiotikum, das die Biosynthese von Chitin in Zellwänden verschiedener Pilze inhibiert (Chapman *et al.*, 1992). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu UDP-GlcNAc inhibiert Nikkomycin Z die Chitinsynthase, deren Substrat UDP-GlcNAc ist. Deshalb wurde untersucht, ob Nikkomycin Z auch ein Inhibitor der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist. Jedoch wurde in Anwesenheit von 1,25 mM Nikkomycin Z nur eine Verringerung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von knapp 10% gemessen. Nikkomycin Z bindet also im Gegensatz zu den Chitinsynthasen sehr schlecht an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Dies läßt vermuten, daß die aktiven Zentren der Chitinsynthasen und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase unterschiedlich aufgebaut sind und die Enzyme ihre Substrate möglicherweise durch unterschiedliche Mechanismen erkennen.

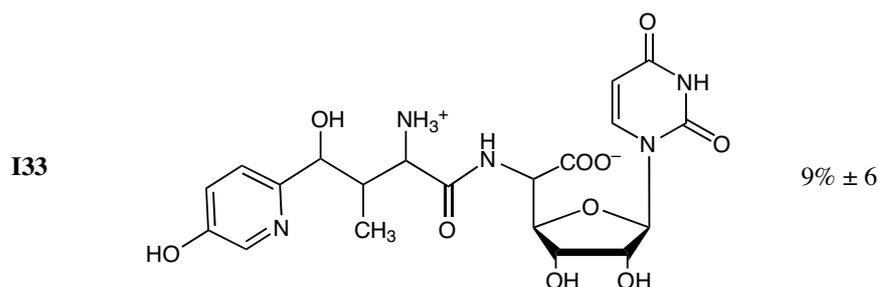


Abbildung 3.34: Struktur und inhibitorische Wirkung von Nikkomycin Z.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit 1,25 mM Nikkomycin Z und 1,25 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relative Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt ($n \geq 5$).

3.6.7 Konzentrationsabhängige Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch ausgewählte Inhibitoren

Für die wirksamsten Inhibitoren sollte die Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration gemessen werden. Dazu wurden jeweils 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0,1 mM Inhibitorsubstanz und 0,5 mM UDP-GlcNAc in den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay gegeben. In Abb. 3.35 sind die ermittelten relativen restlichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten gegenüber den Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Deutlich ist zu erkennen, daß alle Substanzen die UDP-GlcNAc-2-Epimerase konzentrationsabhängig inhibieren. Aus den Inhibitionskurven können IC_{50} -Werte abgeschätzt werden, indem die für eine 50%ige Inhibition notwendige Inhibitorkonzentration ermittelt wird. **I26** hat demnach einen IC_{50} -Wert von etwa 0,4 mM, **I18** von etwa 0,8 mM, **I3** und **I32** von etwa 1,5 mM, **I12** von etwa 2 mM und **I1** von > 2 mM. Damit sind **I26** und **I18** bessere Inhibitoren als **I3**, **I12** und **I1**. Diese Reihenfolge entspricht den bereits vorher erhaltenen relativen Inhibitionswerten dieser Inhibitoren. Eine Ausnahme bildet **I32**, das zwar einen relativ hohen IC_{50} -Wert hat, jedoch bei höheren Inhibitorkonzentrationen eine unerwartet starke Enzyminhibition zeigt. Dies kann durch die stark abfallende Inhibitionskurve erklärt werden (Abb. 3.35).

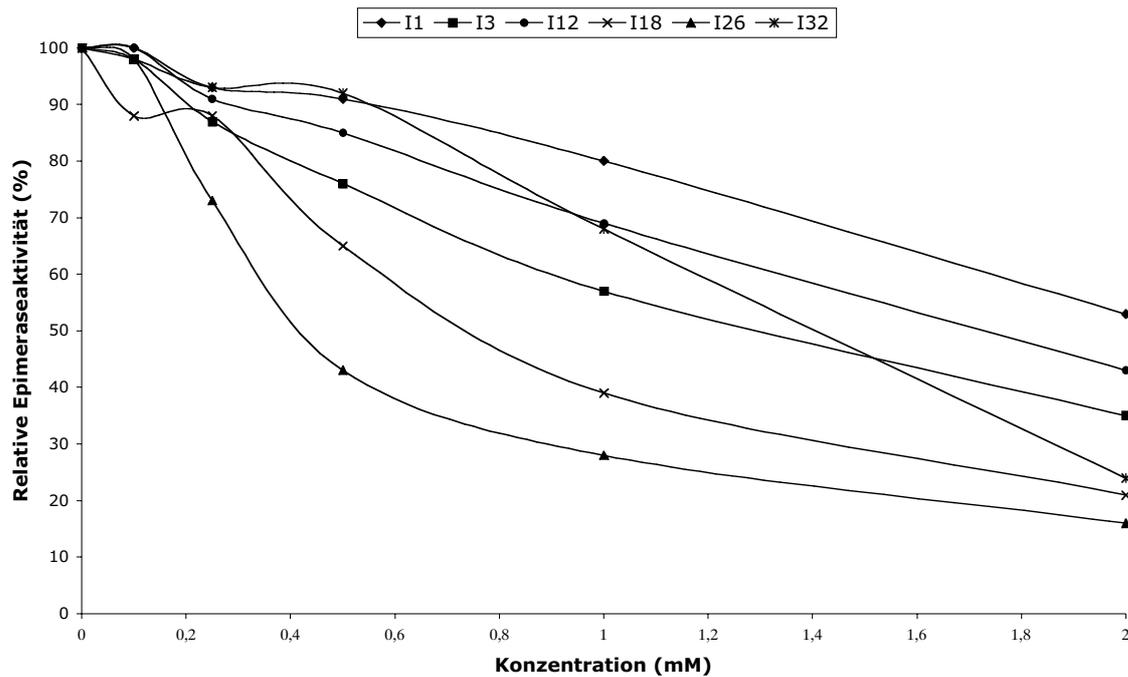


Abbildung 3.35: Relative restliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten bei Inkubation mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde für 30 min mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und 0,5 mM UDP-GlcNAc Substrat bei 37 °C inkubiert. Das von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebildete ManNAc wurde anschließend mit dem Morgan-Elson-Test nachgewiesen und, bezogen auf eine Kontrolle, die relativen restlichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten ermittelt.

Interessanterweise inhibieren die Substanzen **I1**, **I3**, **I12** und **I32** bei Zugabe von 1,25 mM Inhibitor und 1,25 mM UDP-GlcNAc-Substrat die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu mehr als 50%. Bei einer Substrat- und Inhibitorkonzentration von jeweils 0,5 mM konnte jedoch nur eine wesentlich geringere Inhibition gemessen werden. Bei allen Inhibitoren handelt es sich um UDP-Derivate. Werden jeweils die UDP-GlcNAc-Konzentration und die Inhibitorkonzentration addiert, so enthalten die Ansätze der ersten Assays 2,5 mM UDP-Derivate. Die unter diesen Bedingungen ermittelten Inhibitionen entsprechen dann in etwa der Inhibition durch 2 mM Inhibitor in Gegenwart von 0,5 mM UDP-GlcNAc bei der konzentrationsabhängigen Inhibierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Demnach ist die Stärke der Inhibition abhängig von der Gesamtkonzentration der UDP-Derivate. Dies macht deutlich, daß die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase einer komplexen Regulation unterliegt, zu deren Verständnis noch weitere Experimente nötig sind.

3.7 NMR-Untersuchungen zur Ligandenbindung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

3.7.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) ist heute eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von Molekülen. Es können damit nicht nur Aussagen über Anzahl und Art verschiedener Atome in einem Molekül getroffen werden, sondern beispielsweise auch über Bindungswinkel und -abstände. Dadurch ist es möglich, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die dreidimensionale Struktur vieler Moleküle aufzuklären. Der wichtigste Atomkern für die NMR-Spektroskopie ist dabei das Proton. Aber auch andere Kerne, wie ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P sind für die NMR-Spektroskopie von Biomolekülen wichtig.

1946 gelang den Arbeitsgruppen von Bloch und Purcell unabhängig voneinander der erste Nachweis von Kernresonanz-Signalen (Bloch *et al.*, 1946; Purcell *et al.*, 1946). Atomkerne, die einen Spin aufweisen verhalten sich wie winzige Magnete. In einem Magnetfeld orientieren sie sich entweder parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld. Die antiparallele Ausrichtung der Kernspins ist energetisch ungünstiger als die parallele Ausrichtung. Werden die Kerne mit elektromagnetischer Energie angeregt, dann gelingt es, die Kernspins niedriger Energie in solche höherer Energie "umzuklappen". Die Energiedifferenz zwischen den beiden Spinzuständen ist abhängig von der Stärke des äußeren Magnetfeldes. Je stärker das Feld ist, um so mehr Energie muß aufgewendet werden, um die Spins "umzuklappen". Wird für eine konstant eingestrahlte elektromagnetische Energie der Betrag der Energieaufnahme durch eine Probe (= Resonanzfrequenz) gegenüber der magnetischen Feldstärke aufgetragen, so erhält man ein NMR-Spektrum.

Alle Atomkerne in Molekülen sind von Elektronen umgeben. Auch Elektronen sind sich bewegende Ladungen und bauen damit ein kleines lokales Magnetfeld auf. Diese lokalen Magnetfelder überlagern sich mit dem äußeren angelegten Magnetfeld, so daß das effektive Magnetfeld an den Atomkernen von dem externen Feld verschieden ist. Die Atomkerne werden also durch die sie umgebenden Elektronen abgeschirmt. Da sich jeder Atomkern in einer etwas anderen elektronischen Umgebung befindet, wird jeder Kern etwas anders abgeschirmt, d.h. das effektive Magnetfeld ist nicht für jeden Kern gleich. NMR-Instrumente können diese kleinen Unterschiede in den effektiven Magnetfeldern an den verschiedenen Atomkernen detektieren. Deshalb erhält man für die chemisch verschiedenen Atomkerne in einem Molekül jeweils unterschiedliche NMR-Signale. Um die Lage dieser NMR-Signale zu definieren, werden NMR-Spektren kalibriert, meist mit Tetramethylsilan (TMS) oder bei wässrigen Lösungsmitteln mit

3-(Trimethylsilyl)-propionat-2,2,3,3-d₄ (TSP). Die Lage der NMR-Signale der verschiedenen Atomkerne in Bezug auf einen derartigen Standard nennt man chemische Verschiebung. Da die chemische Verschiebung der Atome abhängig von der elektronischen Umgebung der betreffenden Atome ist, kann aus der Lage der Signale auf die nähere chemische Umgebung der Atome geschlossen werden. So haben beispielsweise Elektronegativität und Hybridisierungs-Zustand der Atome einen großen Einfluß, da sie die Bindungselektronen verschieben und so die Atome unterschiedlich gegenüber dem äußeren Magnetfeld abschirmen und damit zu einer unterschiedlichen chemischen Verschiebung führen.

Aus den integrierten Signalen läßt sich gleichzeitig die relative Zahl der Atome ermitteln, da sich diese beiden Größen proportional zueinander verhalten.

Da jeder Atomkern für sich wie ein kleiner Magnet wirkt, beeinflussen sich benachbarte Atomkerne gegenseitig. Dieser Einfluß über chemische Bindungen führt zu der sogenannten Spin-Spin-Kopplung und damit zur Aufspaltung des NMR-Signals. Dabei ist die Art der Signalaufspaltung von der Zahl der benachbarten Kerne abhängig. Die Stärke der Kopplung wird als skalare Kopplungskonstante in Hz gemessen. Das Kopplungsmuster gibt Aufschluß über die Anzahl der benachbarten Kernspins und in bestimmten Fällen über die Bindungswinkel zwischen einzelnen Atomen.

Der NOE (Nuclear-Overhauser-Effekt) beruht auf dipolaren Wechselwirkungen zwischen Spins und unterscheidet sich somit prinzipiell von der Spin-Spin-Kopplung. Mit dem NOE-Experiment können Informationen über die räumliche Nähe von Protonen gewonnen werden. Bei diesen Experimenten wird selektiv die Resonanzfrequenz bestimmter Atome eingestrahlt. Die angeregten Atomkerne geben die aufgenommene Energie wieder an räumlich benachbarte Kerne ab, wobei räumlich nähere Atome mehr Energie aufnehmen als weiter entfernte, da die Intensität des NOE umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes ist.

3.7.2 Das STD-Experiment

Das STD-Experiment (Sättigungstransfer-Differenz-Experiment) ist im Prinzip ein spezielles NOE-Experiment. Beim NOE-Experiment werden bestimmte Atomkerne durch Einstrahlen einer definierten Resonanzfrequenz angeregt. Die angeregten Atomkerne übertragen diese Energie auf räumlich benachbarte Kerne. Diese Übertragung der aufgenommenen Energie auf räumlich nahe Atome ist bei großen Molekülen wesentlich effizienter als bei kleineren. Deshalb ist es beispielsweise möglich, alle Protonen eines Proteins zu sättigen, indem nur auf die Resonanzfrequenz einiger Methylprotonen eingestrahlt wird. Die Energieübertragung ist jedoch nicht auf das Protein alleine beschränkt. So wird auf Liganden, die an ein Protein gebunden sind, während es gesättigt ist, ebenfalls Energie übertragen (Abb. 3.36). Liegt die Dissoziationskonstante (K_D) für einen solchen Liganden im Bereich von etwa

0,1 μM – 10 mM, so binden während des STD-Experimentes zahlreiche Liganden an das Protein, was zu einer starken Änderung des Liganden-Spektrums führt. Bindungskonstanten außerhalb dieses Bereichs führen zu sehr kleinen STD-Effekten, einerseits, weil die Anzahl der gebundenen Liganden zu gering ist, und zum anderen, weil die Kontaktzeit zwischen Protein und Ligand zu kurz ist, um eine ausreichende Menge an Energie zu übertragen.

Da die STD-Effekte für die Wechselwirkung von Protein und Ligand nur relativ gering sind, werden Differenz-Spektren aufgenommen. Dafür werden zwei Spektren aufgenommen, eines, in dem das Protein gesättigt ist, und ein zweites, in dem das Protein nicht gesättigt wurde. Durch die Subtraktion der beiden Spektren voneinander erhält man ein Spektrum, das nur die Unterschiede zwischen den beiden Spektren zeigt. Aus den Signalintensitäten lassen sich Rückschlüsse auf den relativen Abstand der einzelnen Protonen von der Proteinoberfläche ziehen, denn je näher ein Proton dem Protein ist, desto mehr Energie wird übertragen, desto größer ist das STD-Signal.

Damit können aus STD-Experimenten folgende Informationen gewonnen werden (Mayer und Meyer, 1999 und 2001):

- ob verschiedene Liganden an ein Protein binden oder nicht.
- der relative Abstand eines jeden Protons zum Protein (Epitope-Mapping), falls die Liganden binden.

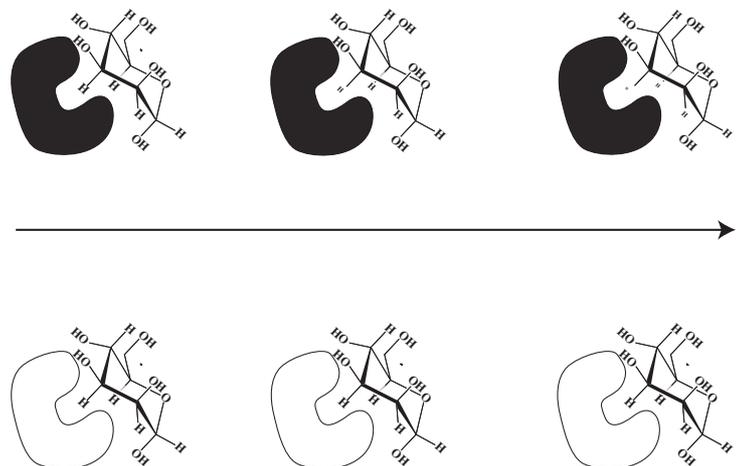


Abbildung 3.36: Energieübertragung im STD-Experiment von einem gesättigten Protein auf einen Liganden mit zunehmender Zeit.

Das gesättigte Protein ist schwarz, das nicht gesättigte im Referenz-Experiment weiß dargestellt. Auf Protonen, die näher an der Proteinoberfläche sind, wird mehr Energie übertragen. Diese Protonen sind als kleinere H dargestellt und geben im STD-Spektrum größere Signale.

3.7.3 NMR-Untersuchungen mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase

Mit STD-NMR ist es möglich, genauere Informationen über Wechselwirkungen zwischen einem Protein und verschiedenen Liganden zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, mit dieser Methode neue Erkenntnisse über die Interaktionen von verschiedenen Substanzen mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu gewinnen. UDP-GlcNAc ist das natürliche Substrat des Enzyms. Um zu sehen, ob es möglich ist, mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase STD-Spektren aufzunehmen, wurde zunächst mit UDP-GlcNAc ein STD-Spektrum unter Standardbedingungen aufgenommen. Dabei zeigte sich, daß UDP-GlcNAc unter diesen Bedingungen gute STD-Spektren liefert, d.h. es bindet bei 5°C mit einem K_D zwischen 0,1 μ M und 10 mM an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Als Substrat des Enzyms wird UDP-GlcNAc jedoch mit der Zeit zu ManNAc und UDP umgesetzt, was zu Signaländerungen im STD-Spektrum führt. Diese detektierten Änderungen zeigen, daß UDP-GlcNAc unter den STD-NMR-Bedingungen nicht nur an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet, sondern auch umgesetzt wird, d.h. die UDP-GlcNAc-2-Epimerase auch aktiv ist.

Durch die Bestimmung des Bindungs epitops konnten für die einzelnen Protonen die jeweiligen relativen Abstände zur Proteinoberfläche ermittelt werden (Abb. 3.37). Es zeigte sich, daß sich die Protonen des Nukleotid-Restes näher an der Proteinoberfläche befinden, während den Protonen des Zucker-Restes eine eher untergeordnete Rolle bei der Bindung zukommt. Besonders die Protonen H-5 und H-6, sowie H-1' sind stark an der Bindung des UDP-GlcNAc an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase beteiligt.

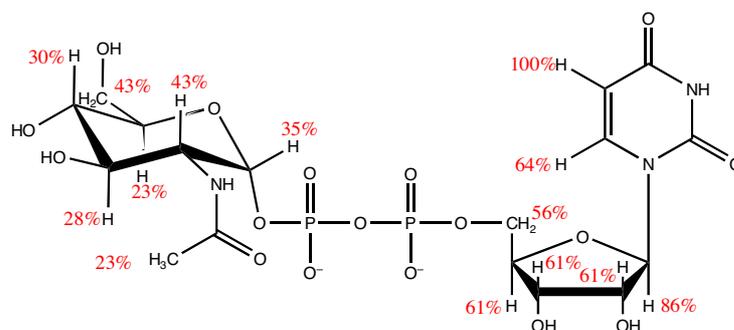


Abbildung 3.37: Bindungsepitop von UDP-GlcNAc.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob und wie Fragmente des UDP-GlcNAc an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase binden. Dabei wurden zum einen GlcNAc und UDP, zum anderen GlcNAc-1-Phosphat und UMP untersucht. Es zeigte sich, daß die STD-Spektren von UDP und UMP fast identisch aussehen. Dies legt nahe, daß beide Liganden an der gleichen Bindungsstelle binden und die Bindung über die gleichen Atome erfolgt. Durch Verdrängungstitration von UDP gegen UMP kann ermittelt werden, welche der beiden Substanzen besser bindet. Dabei zeigte sich, daß UDP

stärker an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet als UMP. Da dem schlechteren Binder UMP die β -Phosphatgruppe fehlt, kann gefolgert werden, daß diese Gruppe eine wichtige Rolle bei der Bindung der Liganden an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase spielt.

GlcNAc-1-Phosphat zeigt ein ähnliches Bindungsepitop wie der Zucker-Anteil des UDP-GlcNAc (Abb. 3.38). Daraus kann gefolgert werden, daß GlcNAc-1-Phosphat an der gleichen Bindungsstelle wie UDP-GlcNAc ans Enzym bindet. GlcNAc hingegen zeigt ein stark abweichendes Bindungsepitop. Das heißt, GlcNAc bindet zwar an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, aber an einer anderen Stelle als UDP-GlcNAc, UDP, UMP und GlcNAc-1-Phosphat. Bereits früher könnte gezeigt werden, daß GlcNAc ein Substrat der ManNAc-Kinase ist. Deshalb liegt es nahe, daß GlcNAc statt an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase an die ManNAc-Kinase bindet. Um dieses zu überprüfen, wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität mit dem irreversiblen Inhibitor o-UDP-GlcNAc gehemmt. Das anschließend aufgenommene STD-Spektrum für GlcNAc ist identisch mit dem GlcNAc-Spektrum des nicht blockierten Enzyms. Daraus muß gefolgert werden, daß GlcNAc nicht oder nur ganz schwach an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet, sondern stattdessen stark von der ManNAc-Kinase gebunden wird. Diese Ergebnisse zeigen, daß für eine gute Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase mindestens eine Phosphatgruppe an den Zucker-Rest gekoppelt sein muß.

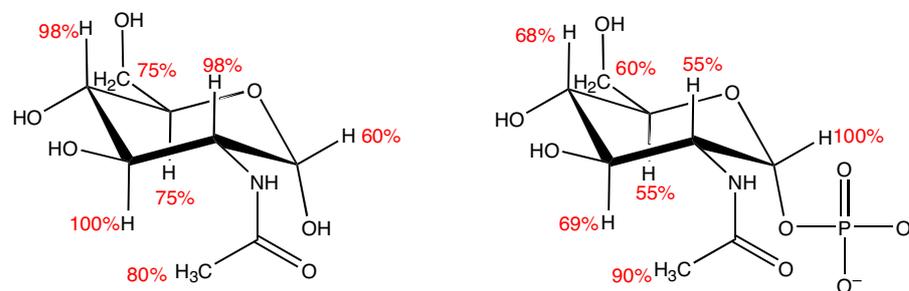


Abbildung 3.38: Bindungsepitope von GlcNAc (links) und GlcNAc-1-Phosphat (rechts).

Durch Verdrängungstitration der einzelnen Liganden gegeneinander können Aussagen über die relativen K_D -Werte der Liganden und damit die Bindungsstärken getroffen werden. Für die untersuchten Liganden ergibt sich danach die folgende Reihenfolge von K_D -Werten:



UDP hat den geringsten K_D -Wert und ist damit der beste Binder der getesteten Substanzen. Überraschenderweise ist UDP damit auch ein besserer Binder als das Substrat UDP-GlcNAc. Da die Konzentration von UDP in der Zelle etwa bei 50 nmol/g, für UDP-GlcNAc bei 200 nmol/g liegt (Keppler *et al.*, 1970), sollten in der Zelle viele

UDP-Moleküle an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase gebunden sein. Dies bedeutet, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität in der Zelle vermutlich ständig zu einem erheblichen Teil durch UDP inhibiert ist.

Viele Enzymreaktionen laufen unter physiologischen Bedingungen bevorzugt in eine Richtung ab, so daß es sinnvoll ist, wenn Edukte sehr gut an das Enzym binden, Produkte jedoch weniger gut binden. Bei der Epimerisierung von UDP-GlcNAc werden UDP und ManNAc als Reaktionsprodukte freigesetzt. Ein Vergleich der STD-Spektren von ManNAc mit blockierter und nicht blockierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase zeigt, daß für das Produkt ManNAc keine Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase detektiert werden kann. Dafür konnte aber eine sehr gute Bindung an die ManNAc-Kinase nachgewiesen werden. ManNAc ist Produkt der Epimerisierungsreaktion, gleichzeitig aber auch Edukt der ManNAc-Kinase-Reaktion, so daß es durchaus sinnvoll ist, daß ManNAc schlecht an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase aber gut an ManNAc-Kinase bindet. Wie bereits oben erwähnt, konnte für das Reaktionsprodukt UDP hingegen eine unerwartet gute Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase nachgewiesen werden.

Die Epimerisierungsreaktion von UDP-GlcNAc zu ManNAc verläuft über die Zwischenstufe 2-Acetamidoglucal. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die Bindung von 2-Acetamidoglucal an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase untersucht. Im STD-Spektrum konnten nur sehr schwache Signale für das Übergangsprodukt 2-Acetamidoglucal detektiert werden. Damit kann 2-Acetamidoglucal sowohl ein sehr schwacher ($K_D > 10$ mM) als auch ein sehr guter ($K_D < 0,1$ μ M) Binder sein. Durch Titration gegen UDP-GlcNAc konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei 2-Acetamidoglucal um einen sehr schlechten Binder handelt. Dies wird durch biochemische Untersuchungen bestätigt, denn bei Inkubation der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mit 2-Acetamidoglucal für 29 h bei 37 °C werden lediglich 6% des 2-Acetamidoglucals zu ManNAc umgesetzt, während UDP-GlcNAc in 2 h komplett zu ManNAc umgesetzt wird (Chou *et al.*, 2003).

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird durch das Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese CMP-Neu5Ac stark Feedback inhibiert. Eine Bestimmung des Bindungssepitops von CMP-Neu5Ac macht deutlich, daß den Protonen H-1' und H-5 eine entscheidende Rolle bei der Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zukommt (Abb. 3.39). Der Zucker-Anteil hingegen spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der Bindung an das Enzym. Lediglich die NHAc-Gruppe des Zuckers wird noch bei der Bindung erkannt. Diese Ergebnisse werden auch durch STD-Experimente mit den Fragmenten von CMP-Neu5Ac bestätigt. CMP bindet recht gut an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase, während Neu5Ac nahezu gar nicht bindet.

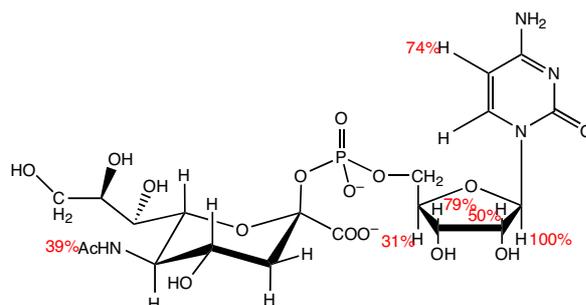


Abbildung 3.39: Bindungsepitop von CMP-Neu5Ac.

Ein Vergleich des Bindungsepitops von CMP und UMP zeigt, daß beide Substanzen ein sehr ähnliches Bindungsepitop haben (Abb. 3.40). Dies legt nahe, daß beide Substanzen an der gleichen Bindungsstelle binden. Eine Titration von CMP gegen UMP zeigt, daß beide Substanzen kompetitiv an die gleiche Bindungsstelle binden, wobei UMP ein geringfügig besserer Binder ist als CMP. Daraus muß gefolgert werden, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase nicht in der Lage ist, zwischen den Nukleotiden Uridin und Cytidin zu unterscheiden. Deshalb wurde in weiteren Experimenten CMP-Neu5Ac gegen UDP titriert. Aus diesen NMR-Spektren wird deutlich, daß auch UDP und CMP-Neu5Ac kompetitiv an die gleiche Bindungsstelle binden.

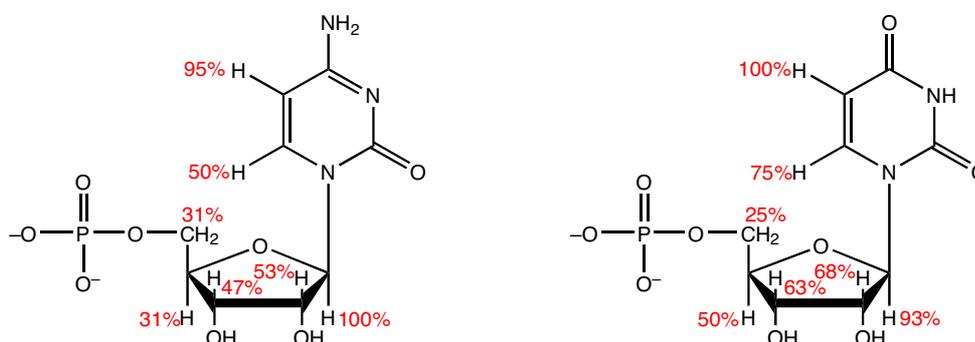


Abbildung 3.40: Bindungsepitope für CMP (links) und UMP (rechts).

3.7.4 NMR-Untersuchungen mit der ManNAc-Kinase

Die ManNAc-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von ManNAc durch ATP, wobei ManNAc-6-Phosphat und ADP entstehen. Für die geplanten STD-Untersuchungen mußte zunächst nachgewiesen werden, daß das Enzym unter STD-NMR-Bedingungen aktiv ist. Dafür wurde die ManNAc-Kinase mit ManNAc und ATP unter den Standard-STD-NMR-Bedingungen inkubiert. Über die Zeit konnte in 1D-NMR-Spektren die Bildung von ManNAc-6-Phosphat und ADP nachgewiesen werden. Das heißt, daß auch die ManNAc-Kinase unter den STD-Bedingungen aktiv ist.

In den NMR-Spektren der ManNAc-Kinase-Reaktion konnte zunächst nur α -ManNAc-6-Phosphat nachgewiesen werden, β -ManNAc-6-Phosphat wird erst zu späteren Zeitpunkten detektiert. Die ManNAc-Kinase katalysiert also selektiv die Bildung von α -ManNAc-6-Phosphat. β -ManNAc-6-Phosphat entsteht später durch Mutarotation der α -Form in die β -Form.

Um die Wechselwirkungen zwischen der ManNAc-Kinase und verschiedenen Liganden zu untersuchen, wurden jeweils STD-Spektren mit den Edukten ATP und ManNAc sowie den Produkten ADP und ManNAc-6-Phosphat (synthetisiert von Dr. A. J. Benie) aufgenommen. Es zeigte sich, daß die Produkte ADP und ManNAc-6-Phosphat schlechter an die ManNAc-Kinase binden als die Edukte ATP und ManNAc. Wie bereits bei der UDP-GlcNAc-2-Epimerase diskutiert, ist es sehr sinnvoll, wenn die Edukte besser an ein Enzym binden als die Produkte. Auf diese Weise kann das Gleichgewicht einer Enzymreaktion stark auf die Seite der Edukte verschoben werden.

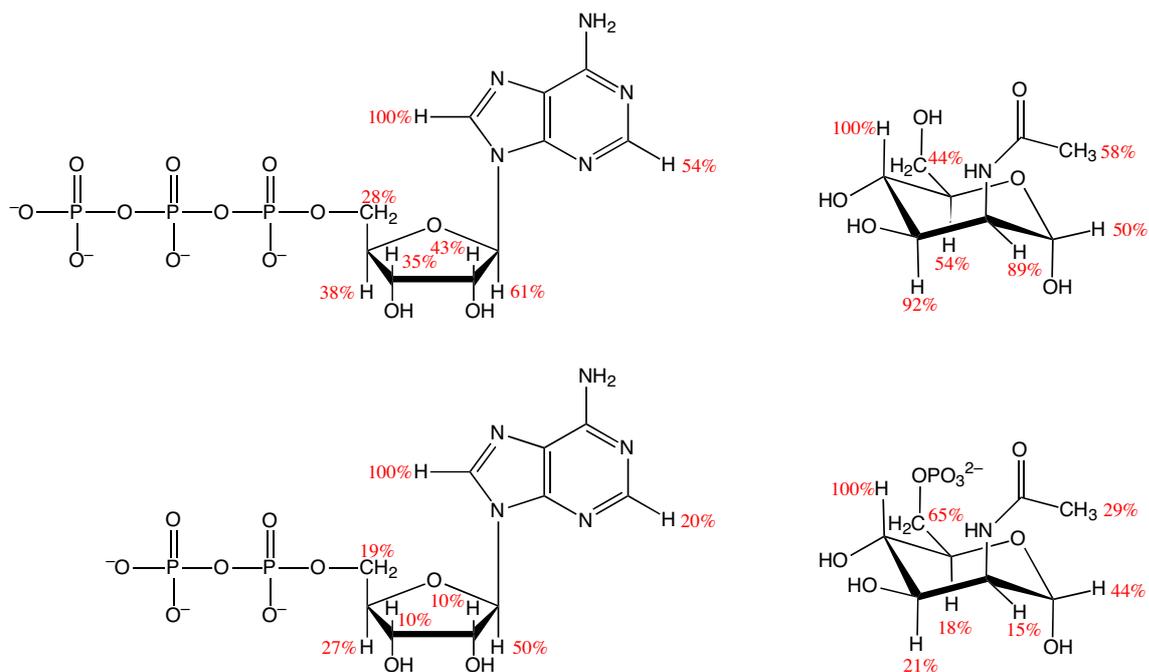


Abbildung 3.41: Bindungsepitope von ATP (oben links), ADP (unten links), ManNAc (oben rechts) und ManNAc-6-Phosphat (unten rechts).

Für die Produkte und Edukte der ManNAc-Kinase-Reaktion konnte nicht nur ein Unterschied in den relativen K_D -Werten nachgewiesen werden, sondern auch große Unterschiede bei den Bindungsepitopen (Abb. 3.41). So zeigen die Bindungsepitope von ManNAc und ManNAc-6-Phosphat für alle Protonen signifikante Unterschiede, außer für die Protonen am C-1 und C-4. Die Bindungsepitope von ADP und ATP weisen besonders große Unterschiede für H-2', H-3' und H-2 auf. Bei der

Phosphorylierung von ManNAc durch ATP ändert sich demnach das Bindungsepitop der Liganden und damit auch der K_D -Wert.

An Hand von 1D-NMR-Spektren konnte gezeigt werden, daß die ManNAc-Kinase selektiv α -ManNAc-6-Phosphat bildet. STD-Spektren von ManNAc-6-Phosphat hingegen zeigen, daß das Enzym zwar bevorzugt α -ManNAc-6-Phosphat bindet, jedoch zu geringen Anteilen auch β -ManNAc-6-Phosphat akzeptiert.

Für ManNAc konnte gezeigt werden, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ausschließlich α -ManNAc bindet, obwohl in Lösung das β -Anomer überwiegt. Durch den irreversiblen Inhibitor o-UDP-GlcNAc konnte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität des bifunktionellen Enzyms blockiert und so nachgewiesen werden, daß eine detektierbare Bindung von ManNAc ausschließlich an die ManNAc-Kinase erfolgt. Somit bindet die ManNAc-Kinase selektiv α -ManNAc (Abb. 3.42).

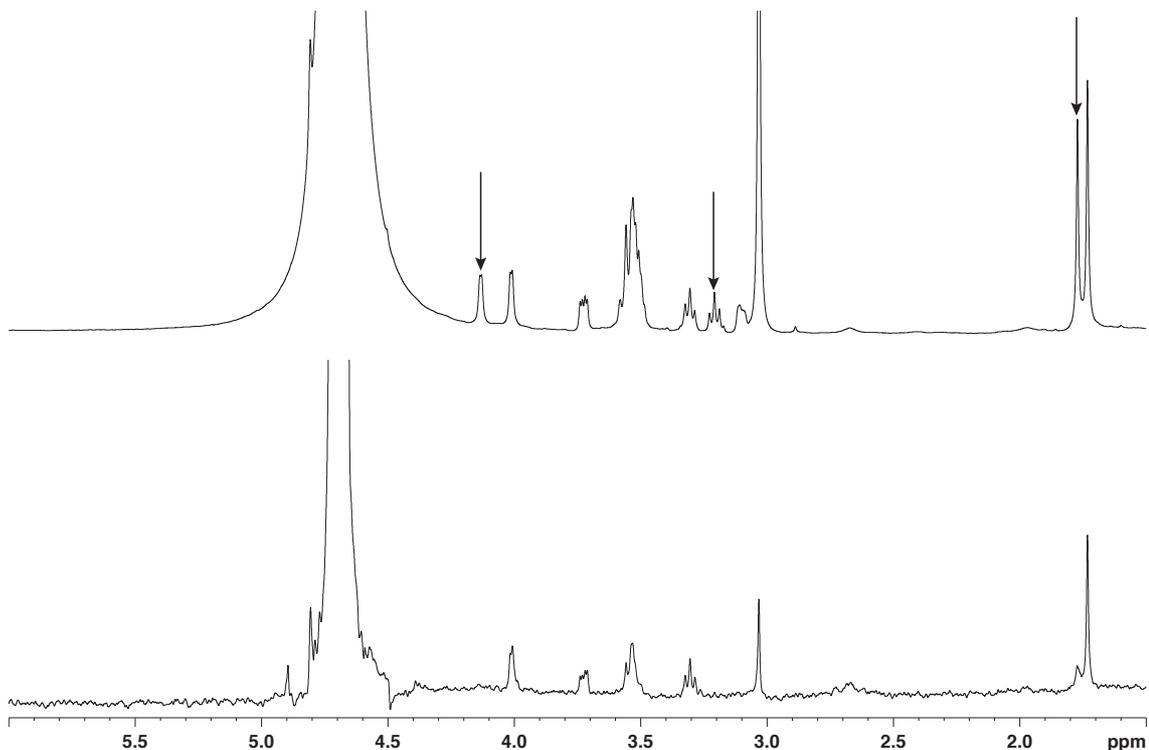


Abbildung 3.42: Referenz- (oben) und STD-Spektrum (unten) von ManNAc mit der ManNAc-Kinase.

Die Pfeile kennzeichnen die fehlenden Signale des β -ManNAc (von links nach rechts H-2, H-4 und die NHAc-Gruppe).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die ManNAc-Kinase neben ManNAc auch ManNProp, ManNBut und GlcNAc phosphoryliert, nicht jedoch GalNAc. Bei einer Konzentration von 5 mM wurde GlcNAc zu 10%, ManNProp zu 17% und ManNBut zu 12% umgesetzt. Um zu sehen, über welche Protonen und wie stark diese Substanzen an die ManNAc-Kinase binden, wurden STD-Spektren mit

diesen Substanzen aufgenommen. Es zeigte sich, daß ManNAc ein besserer Binder als GlcNAc, ManNProp und schließlich ManNBut ist. Zwischen ManNAc und GlcNAc besteht nur ein kleiner Unterschied in den K_D -Werten. Ein großer Unterschied wurde hingegen zwischen GlcNAc und ManNProp festgestellt, während zwischen ManNProp und ManNBut wieder nur ein geringer Unterschied in den K_D -Werten ermittelt wurde.

Ein Vergleich der Bindungsepitope dieser Substanzen zeigt, daß ManNAc und ManNProp ähnliche Bindungsepitope aufweisen (Abb. 3.43). Unterschiede in den Reaktivitäten dieser beiden Substanzen können damit durch eine Änderung der K_D -Werte erklärt werden. ManNBut zeigt hingegen ein stark verändertes Bindungsepitop, wobei die größte Änderung für das C-4 Proton detektiert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, daß ManNBut auf eine andere Art und Weise an die ManNAc-Kinase bindet als ManNProp, obwohl beide Substanzen ähnliche K_D -Werte zeigen. Damit wäre die schlechtere Reaktivität des ManNBut durch die veränderte Bindung der Substanz an das Enzym zu erklären. Auch GlcNAc zeigt ein stark verändertes Bindungsepitop, obwohl es einen ähnlichen K_D -Wert wie ManNAc aufweist. Trotzdem wird GlcNAc signifikant schlechter von der ManNAc-Kinase umgesetzt als ManNAc. Das veränderte Bindungsepitop läßt vermuten, daß GlcNAc in einer anderen Art und Weise an die ManNAc-Kinase bindet und deshalb schlechter umgesetzt wird. Für das C-4-Epimer GalNAc konnte keine Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nachgewiesen werden.

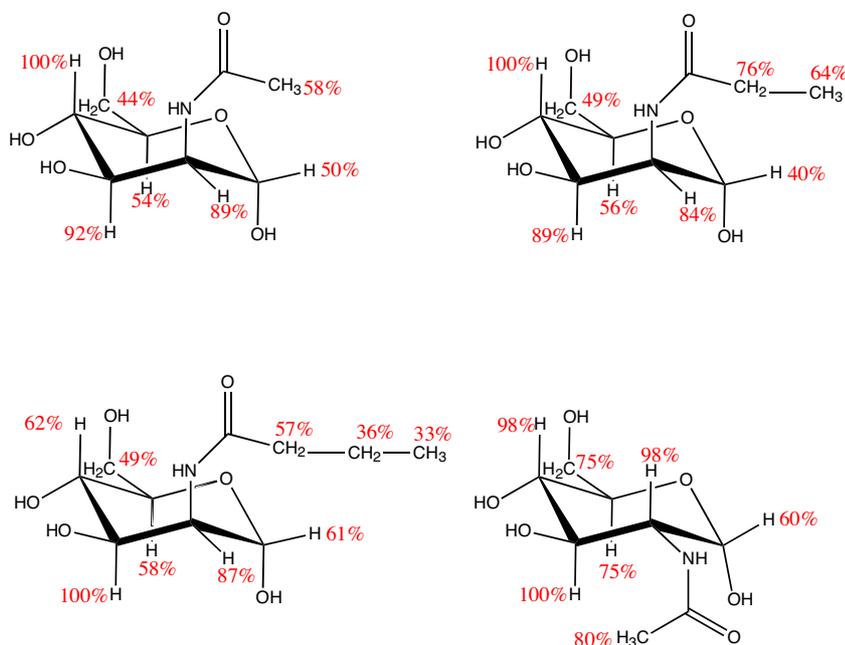


Abbildung 3.43: Bindungsepitope von ManNAc (oben links), ManNProp (oben rechts), ManNBut (unten links) und GlcNAc (unten rechts).

Von zahlreichen Kinasen ist bekannt, daß Mg^{2+} essentiell für die Enzymreaktion ist. Für die ManNAc-Kinase konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß das Enzym auch ohne die Anwesenheit von Mg^{2+} aktiv ist, da dem Puffersystem für die STD-Messungen kein Mg^{2+} zugesetzt wurde. Dennoch sollte untersucht werden, ob Mg^{2+} einen Einfluß auf die Enzymreaktion der ManNAc-Kinase hat. Die Anwesenheit von 0,1 mM $MgCl_2$ in der Probe führte zu einer starken Steigerung der Enzymaktivität. Für einen kompletten Umsatz von ManNAc zu ManNAc-6-Phosphat werden in Abwesenheit von Mg^{2+} etwa 12 h benötigt. Unter den gleichen Bedingungen werden bei Zugabe von Mg^{2+} aber nur 80 min für einen kompletten Umsatz von ManNAc benötigt. Mg^{2+} ist demnach für die ManNAc-Kinase-Reaktion nicht notwendig, hat aber einen signifikanten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Vermutlich beeinflußt Mg^{2+} die Bindung von ATP an die ManNAc-Kinase und beschleunigt so die Enzymreaktion. Ein Vergleich der STD-Spektren von ATP mit und ohne Mg^{2+} zeigt, daß sich bei Zugabe von Mg^{2+} die Bindungs epitope der Protonen nahe der Phosphat-Reste ändern. Mg^{2+} interagiert also vermutlich mit den Phosphatgruppen des ATP und bewirkt so eine bessere Bindung an die ManNAc-Kinase.

