

4. Diskussion

4.1. Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Für zahlreiche biochemische Untersuchungen, wie z.B. das Studium von Substrat-Protein-Wechselwirkungen, das Testen verschiedener potentieller inhibitorischer Substanzen, aber auch die angestrebte Kristallisation, muß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als gereinigtes Enzym in größeren Mengen vorliegen. Von Hinderlich *et al.* (1997) konnte das Enzym aus Rattenleber bis zur Homogenität gereinigt werden. Dabei ließen sich aus 20 g Rattenleber jedoch nur etwa 100 µg reines Enzym isolieren. Um das Enzym funktionell in größeren Mengen zu exprimieren, sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes Expressionssystem für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase gesucht werden.

Zunächst wurde versucht, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in dem einfachen, leicht handhabbaren prokaryontischen Expressionssystem *Escherichia coli* zu exprimieren. Um das Enzym später leichter reinigen zu können, wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit einem N-terminalen His- bzw. GST-Tag exprimiert. In beiden Fällen konnte das Enzym funktionell exprimiert werden. Nach dem Aufbrechen der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation konnten 0,3-0,5 mg/l His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase bzw. 1-2 mg/l GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand detektiert werden. Der überwiegende Teil des überexprimierten Proteins wurde nach dem Lysieren der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation jedoch in den Pellets gefunden. Aus den proteinhaltigen Überständen konnten jeweils nur 80 µg hexamere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase pro Liter Bakterienkultur isoliert werden.

Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit GST-Tag konnten neben Hexameren auch Aggregate ≥ 2 MDa nach dem Aufbrechen der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation im proteinhaltigen Überstand detektiert werden. Der GST-Tag führt im Vergleich zum His-Tag scheinbar zur Ausbildung kleinerer oder besser löslicher Aggregate, die beim Zentrifugieren nicht pelletiert werden, sondern als lösliche Aggregate im Überstand verbleiben. So werden im Überstand neben löslichen Hexameren auch lösliche Aggregate der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase beobachtet. Bei der Expression mit His-Tag scheinen die gebildeten Aggregate jedoch so groß bzw. unlöslich zu sein, daß sie beim Zentrifugieren pelletiert werden und nur die löslichen Hexamere in den Überstand

gelangen. Deshalb befinden sich nach dem Aufbrechen der Bakterienzellen und anschließender Zentrifugation 1-2 mg/l GST-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, aber nur 0,3-0,5 mg/l His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im proteinhaltigen Überstand.

Da aus Bakterien nur ähnlich niedrige Mengen an hexamerer UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isoliert werden können wie aus Rattenleber, wurde versucht, das Enzym in dem eukaryontischen, aber noch relativ einfach handhabbaren Organismus *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Auch in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* gelang die funktionelle Expression des Proteins. Jedoch konnte mit 34 $\mu\text{g/l}$ keine bessere Expression als in Bakterien erzielt werden. Deshalb wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase anschließend in der hochexprimierenden Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. In diesem Organismus konnten bis zu 400 $\mu\text{g/l}$ hexameres aktives Enzym im Cytosol detektiert werden. Unabhängig von den zahlreichen verschiedenen Expressionsbedingungen und den unterschiedlichen verwendeten Hefestämmen wurde, genau wie bei Bakterien, der überwiegende Teil des überexprimierten Enzyms jedoch nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation in den Pellets gefunden. Somit liegen auch hier die tatsächlichen Expressionsraten wesentlich höher, denn der größte Teil des überexprimierten Proteins wird in Aggregaten eingelagert und anschließend beim Zentrifugieren pelletiert, so daß im proteinhaltigen Überstand lediglich maximal 400 $\mu\text{g/l}$ hexamere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase verbleiben.

Für die Kristallisation, aber auch für andere biochemische Untersuchungen, wie STD-NMR, werden einige Milligramm gereinigtes Protein benötigt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Expressionssystem, das Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen ausprobiert. Bei der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Insektenzellen werden bis zu 100 mg hexameres epimerase- und kinaseaktives Protein pro Liter Zellkultur detektiert. Damit können mit diesem Expressionssystem die größten Enzym-Mengen gewonnen werden, obwohl auch hier der überwiegende Teil des überexprimierten Enzyms nach dem Lysieren der Zellen und anschließender Zentrifugation im Pellet nachgewiesen wird. Die größeren löslichen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Mengen in den Insektenzellen lassen sich vermutlich durch die Anwesenheit von speziellen Chaperonen begründen, die die Faltung größerer Proteine unterstützen. Von *E. coli* ist beispielsweise bekannt, daß ihre Chaperone nur eine Faltung von Proteinen bis zu einer Größe von 60 kDa unterstützen (Weber *et al.*, 1998). Je höher die Organismen jedoch entwickelt sind, desto mehr wird die funktionelle Expression größerer Proteine begünstigt.

Für die meisten geplanten biochemischen Untersuchungen mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase muß das Enzym in gereinigter Form vorliegen. Deshalb

wurde versucht, das in Insektenzellen exprimierte Enzym über zahlreiche Säulenkombinationen zu reinigen. Durch die Reinigung über die MonoQ-Säule und eine Gelfiltrationssäule konnte zu 90% reines Protein isoliert werden. Wird dieser Reinigung noch eine Phenylsepharose-Säule vorgeschaltet, so kann zu 100% reines Enzym gewonnen werden. Bei diesen Reinigungen werden am Ende zwischen 3 und 4 mg/l gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isoliert.

Für eine effektive Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde das Enzym parallel mit einem N-terminalen His-Tag in Insektenzellen exprimiert. Die Reinigung der His-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase über eine Ni-NTA-Agarose-Säule liefert etwa 50 mg/l gereinigtes Protein, mit einer Reinheit $\geq 90\%$. Damit stellt die Expression des Enzyms in Insektenzellen und die anschließende Reinigung des Enzyms über eine Ni-NTA-Säule die effektivste Methode zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase dar. Für einige Untersuchungen, wie z.B. die Kristallisation, könnte sich der 52 Aminosäuren lange His-Tag jedoch störend auswirken, so daß in diesen Fällen besser auf die Reinigung mittels MonoQ-Säule und Gelfiltrationssäule bzw. eventuell noch vorgeschalteter Phenylsepharose-Säule ausgewichen werden sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sowohl in den prokaryontischen *E. coli*, als auch in den eukaryontischen Hefen und Insektenzellen funktionell exprimieren läßt. Diese Organismen unterscheiden sich durch das Einführen zahlreicher posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Glycosylierungen oder Phosphorylierungen. Da sich die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber jedoch in all diesen Organismen funktionell exprimieren läßt, kann man schließen, daß artspezifische Modifikationen nicht essentiell für die Funktion des Enzyms sind.

In Insektenzellen konnte die größte Menge an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase exprimiert werden. Jedoch ist die Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen recht aufwendig und die Kultivierung der Zellen recht störanfällig. Deshalb ist die Expression des Enzyms in den wesentlich einfacher handhabbaren Bakterien und Hefen für viele Versuche vorteilhafter. So werden beispielsweise für die Analyse und Charakterisierung zahlreicher Mutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase nur geringe Mengen an Protein benötigt, so daß deren Expression in Hefen oder Bakterien bevorzugt werden sollte. Seppala *et al.* (1999) konnten erfolgreich verschiedene Punktmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase in *E. coli* Zellen exprimieren und deren Aktivitäten ermitteln.

Sowohl bei den Bakterien als auch bei den Hefen und den Insektenzellen wird eine große Neigung zur Bildung von Aggregaten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-

Kinase beobachtet. Daraus kann man schließen, daß die Ursache für die Bildung der Aggregate vermutlich in den Eigenschaften der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Moleküle liegt und nicht an Eigenschaften der gewählten Expressionssysteme.

Von Bakterien ist bekannt, daß sie überexprimierte Proteine oftmals in sogenannten Inclusion-Bodies einlagern (Makrides, 1996). Diese Proteine sind meist fehlerhaft prozessiert oder falsch gefaltet und oftmals sogar noch durch falsche kovalente Bindungen verknüpft, so daß sie nicht mehr enzymatisch aktiv sind. Manchmal sind diese Inclusion-Bodies noch von Membranen umgeben. Solche Inclusion-Bodies sind bei höheren Expressionsraten auch für Insektenzellen und Hefen beschrieben (Cousens *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1990). Die überexprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zeigt jedoch im Gegensatz zu gewöhnlichen Inclusion-Bodies Enzymaktivitäten. Deshalb wurde versucht, die unlöslichen Proteine durch Behandlung mit verschiedenen Reagenzien in Lösung zu bringen. Jedoch ließ sich der Anteil an löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch keines der Reagenzien erhöhen. Nur unter denaturierenden Bedingungen konnten die Aggregate aufgelöst werden. Damit konnte gezeigt werden, daß die Aggregate nicht durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Vermutlich sind äußerst starke hydrophobe und eventuell hydrophile bzw. ionische Wechselwirkungen für die Ausbildung der Aggregate verantwortlich.

N-Terminale bzw. C-terminale Deletionen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase senken den Anteil löslicher UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase drastisch. Den deletierten Proteinen fehlen vermutlich hydrophile Bereiche, so daß eine verstärkte Unlöslichkeit bewirkt wird. Dies legt nahe, daß die Aggregate der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase weniger durch hydrophile bzw. ionische Wechselwirkungen, sondern vielmehr durch starke hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Moleküls zusammengehalten werden.

4.2 Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Durch die Einführung verschiedener Punktmutationen im UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen konnte gezeigt werden, daß die Epimerase- und die Kinase-Funktion des bifunktionellen Enzyms unabhängig voneinander arbeiten (Effertz *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob sich diese beiden Funktionen auch getrennt voneinander exprimieren lassen. Dafür wurden N- und C-terminal Deletionen in das UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen eingeführt und die resultierenden Proteine auf Enzymaktivitäten untersucht. Dabei

zeigte sich, daß sich sowohl die UDP-GlcNAc-2-Epimerase als auch die ManNAc-Kinase funktionell getrennt von der jeweils anderen Funktion exprimieren ließ. Das heißt, daß für die Funktion der beiden Enzymaktivitäten die jeweils andere Domäne nicht erforderlich ist. Jedoch führt der Verlust der jeweils anderen Domäne zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivitäten. Für die optimale Enzymaktivität sind somit noch Aminosäuren oder Strukturen aus der jeweils anderen Domäne erforderlich.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne weist Homologien zu prokaryontischen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen auf, während die ManNAc-Kinase zu verschiedenen Zuckerkinasen Homologien zeigt (Effertz *et al.*, 1999). Es ist deshalb spekuliert worden, daß die prokaryontischen monofunktionalen Enzyme und die bifunktionelle UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase gemeinsame evolutionäre Vorläufer haben. Aus diesen Vorläufern sind einerseits die prokaryontischen Enzyme hervorgegangen, zum anderen durch Genfusion und weitere Mutationen die bifunktionelle UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Eine derartige Genfusion muß im Rahmen der Evolution schon vor längerer Zeit erfolgt sein, denn durch Mutationen haben sich die beiden Domänen des bifunktionellen Enzyms anschließend weiter spezialisiert und stark aneinander angepaßt. Eine Trennung der beiden funktionellen Domänen ist zum heutigen Zeitpunkt zwar noch möglich, doch führt sie zu einer drastischen Reduktion der beiden Enzymaktivitäten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß den Aminosäuren 1-39 eine besondere Rolle in der bifunktionellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zukommt. Eine Deletion dieser Aminosäuren führt bereits zu einem kompletten Verlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität, d.h., daß diese Aminosäuren essentiell für die Epimeraseaktivität sind. Daraus muß gefolgert werden, daß diese Aminosäuren sich zumindest zum Teil im aktiven Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase befinden bzw. an dessen Ausbildung maßgeblich beteiligt sind.

Gleichzeitig führt ein Verlust dieser ersten 39 Aminosäuren zu einer drastischen Reduktion der ManNAc-Kinase-Aktivität. Da jedoch noch Kinaseaktivität bei der Δ 1-39-Deletionsmutante nachgewiesen werden kann, sind diese Aminosäuren nicht essentiell für die ManNAc-Kinase-Aktivität, haben aber einen starken Einfluß auf die Enzymaktivität. Vermutlich beeinflussen diese ersten 39 Aminosäuren die ManNAc-Kinase-Aktivität indirekt, indem sie sich positiv auf die Struktur oder die Stabilität der Kinasedomäne auswirken und so eine optimale Funktion dieser Domäne gewährleisten.

Zuckerkinasen weisen im allgemeinen fünf relativ stark konservierte Sequenzmotive für die Bindung von ATP auf (Bork *et al.*, 1992). Diese Motive, das Phosphat 1, das Connect 1, das Phosphat 2, das Adenosin und das Connect 2 werden auch bei der ManNAc-Kinase gefunden. Bei der Δ 716-722-Mutante wurde ein Stopcodon direkt

hinter dem Connect 2-Motiv, dem C-terminalsten Motiv, eingeführt. Diese Deletion hat nahezu keinen Einfluß auf die ManNAc-Kinase-Aktivität. Die $\Delta 697-722$ -Mutante weist einen Verlust des kompletten Connect 2-Motives auf. Dieser Verlust führt zu einer Reduktion der ManNAc-Kinase-Aktivität um etwa 60%. Das Einführen eines Stopcodons am Ende des Adenosin-Motivs reduziert die Kinaseaktivität dann auf Werte nahe der Nachweisgrenze. Ein weiterer Verlust von Aminosäuren bewirkt einen kompletten Verlust der ManNAc-Kinase-Aktivität.

Das Connect 2-Motiv scheint eine bedeutende Rolle bei der Bindung von ATP und damit für die Kinase-Aktivität zu spielen, denn ein Verlust dieses Motivs reduziert die ManNAc-Kinase-Aktivität auf etwa 40%. Aber auch die Aminosäuren zwischen dem Adenosin- und dem Connect 2-Motiv tragen maßgeblich zur ManNAc-Kinase-Aktivität bei, da ein Verlust dieser Aminosäuren die Kinase-Aktivität von etwa 40% auf Werte nahe der Nachweisgrenze reduziert. Diese Aminosäuren zwischen dem Adenosin- und dem Connect 2-Motiv könnten aber eher mit der Stabilisierung katalytisch wichtiger Strukturelemente der ManNAc-Kinase-Domäne in Zusammenhang stehen, als daß sie direkt am katalytischen Prozeß beteiligt sind.

Die eingeführten Deletionen in der bifunktionellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase haben nicht nur einen Einfluß auf die Enzymaktivitäten, sondern auch auf den oligomeren Zustand des Enzyms. Bei den meisten Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnten trimere Strukturen nachgewiesen werden. Auch beim Crosslinking des Enzyms mit oxidierten UDP-GlcNAc Derivaten und nach dem Einführen von Punktmutationen in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne (Effertz *et al.*, 1999) wurden Trimere detektiert. Weiterhin konnten Trimere durch Crosslinking von Cysteinen mit Natriummetaperiodat bzw. Diazendicarbonsäure-*bis*-N,N'-dimethylamid nachgewiesen werden (Hinderlich, 1997). In keinem der Fälle konnten jedoch Dimere detektiert werden. Diese Strukturen wurden bei der Bestimmung des oligomeren Zustandes von gereinigter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber mittels Gelfiltrationssäule detektiert (Hinderlich *et al.*, 1997). Bei der Expression in Insektenzellen und verschiedenen Crosslinking-Experimenten konnten jedoch lediglich Trimere nachgewiesen werden, so daß noch weitere Untersuchungen nötig sind, um zu klären, unter welchen Bedingungen das Enzym eher als Dimer oder als Trimer vorliegt.

Bis heute konnte nur hexameres Protein mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität detektiert werden (Hinderlich *et al.*, 1997), wobei nicht klar ist, ob diese Hexamere ein oder mehrere, eventuell bis zu sechs, aktive Zentren haben. ManNAc-Kinase aktives Protein wurde hingegen als Hexamer, Dimer und Trimer gefunden (Hinderlich *et al.*, 1997; Effertz *et al.* 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Trimere mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität nachgewiesen werden. Für das Substrat

UDP-GlcNAc konnte bereits früher eine starke negative Kooperativität nachgewiesen werden (Hinderlich *et al.*, 1997), was mehr als ein aktives Zentrum für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität voraussetzt. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den detektierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase aktiven Trimeren erstmals ein klarer struktureller Beweis für mehr als ein aktives Zentrum für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität vorgelegt werden.

Normalerweise liegt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als Hexamer vor, das vermutlich ein aus zwei Trimeren assoziiertes Protein ist. Die Aminosäuren in den Bereichen 1-234 und 597-722 haben nur einen geringen Einfluß auf die oligomere Struktur des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, denn Deletionen in diesen Bereichen führen nicht zu einem Verlust des Hexamers. Jedoch können bereits bei der Δ 1-234 Mutante kleinere Oligomere als die erwarteten Hexamere detektiert werden, vermutlich Trimere. Auch eine weitere Deletion der Kinasedomäne führt zur verstärkten Ausbildung von Trimeren. Bereits bei Verlust der nächsten 100 Aminosäuren, also Aminosäure 490-596, überwiegt der Anteil der Trimere gegenüber den Hexameren. Deshalb kommt den Aminosäuren 490-596 eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung der Trimere zu. Jedoch sind nicht nur diese Aminosäuren für die Dimerisierung der Trimere nötig, sondern auch Aminosäuren im Bereich von 234-490. Dies zeigt, daß die hexamere Struktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase komplex über sekundäre bzw. tertiäre Strukturen geregelt ist und nicht nur auf eine einfache Dimerisierungsstelle zurückgeführt werden kann.

Dimere, so wie sie bei der Reinigung des Enzyms aus Rattenleber detektiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Zur Ausbildung eines Hexamers aus derartigen Dimeren müßten sich drei Dimere zusammenlagern. Eine derartige Trimerisierungsstelle könnte sich nur zwischen den Aminosäuren 360 bis 382 befinden, da die Deletionsmutante Δ 1-359 überwiegend als Hexamer vorliegt und die Mutante Δ 383-722 als Trimer und nicht als Monomer und/oder Dimer detektiert wird.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnten essentielle Strukturen für die Dimerisierung der detektierten Trimere der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zwischen den Aminosäuren 234 und 596 lokalisiert werden. Jedoch führten Punktmutationen der Histidine 155 und 157 ebenfalls zur Ausbildung von Trimeren (Effertz *et al.*, 1999), Hexamere konnten hier nicht mehr nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, denn danach dürften Deletionsmutanten, denen die ersten 155 Aminosäuren fehlen, nicht als Hexamere vorliegen. Die Mutante Δ 1-234 liegt aber eindeutig noch zum überwiegenden Teil als Hexamer vor.

Die Epimeraseaktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase unterliegt der Feedback-Inhibierung durch CMP-Neu5Ac (Kornfeld *et al.*, 1964). Auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase aktiven Deletionsmutanten lassen sich alle durch CMP-Neu5Ac hemmen. Bei der Inhibierung der Proteine durch CMP-Neu5Ac zeigen sich jedoch starke Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten und im Vergleich zum Wildtyp. Je größer die eingeführten Deletionen sind, desto stärker lassen sich die Proteine hemmen. Die eingeführten Deletionen führen demnach zu einer besseren Bindung von CMP-Neu5Ac an die Proteine. Aber auch eine verbesserte bzw. verstärkte Kooperativität wäre eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse. Die Unterschiede in der Stärke der Inhibierung könnten jedoch auch auf unterschiedliche Mengen an aktivem Protein zurückzuführen sein. Obwohl bei allen Versuchen die Proteinkonzentration $0,1 \mu\text{M}$ betrug, ist es denkbar, daß davon nur unterschiedliche Anteile aktiv waren, da beispielsweise unterschiedlich viel Protein in Aggregaten vorlag. Je geringer der Anteil des aktiven Proteins ist, desto stärker wäre demnach die Inhibierung.

Interessanterweise konnte die überexprimierte Wildtyp-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen mit $70 \mu\text{M}$ CMP-Neu5Ac nur zu 20% inhibiert werden, während das aus Rattenleber isolierte Enzym durch $70 \mu\text{M}$ CMP-Neu5Ac komplett inhibiert wird (Hinderlich *et al.*, 1997). Diese Unterschiede könnten sich durch unterschiedliche Mengen an aktivem Protein in den Assays begründen lassen. Die aus Rattenleber isolierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase zeigt eine spezifische Aktivität von etwa 900 mU/mg (Hinderlich *et al.*, 1997), während das aus Insektenzellen isolierte Enzym eine spezifische Aktivität von bis zu 10000 mU/mg zeigt. Damit ist die aus Insektenzellen isolierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase etwa um den Faktor 10 aktiver als das aus Rattenleber isolierte Enzym. Das Verhältnis von CMP-Neu5Ac zu aktivem Protein ist somit für das aus Rattenleber gereinigte Enzym etwa um den Faktor 10 besser, so daß eine wesentlich stärkere Inhibition nachgewiesen werden kann.

4.3 Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch oxidierte UDP-GlcNAc-Derivate

Für die humane Hyaluronat-Synthase und die Methylcoenzym M Methylreduktase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, die beide UDP-GlcNAc für die von ihnen katalysierte Reaktion benötigen, konnte gezeigt werden, daß sie durch oxidiertes UDP-GlcNAc (o-UDP-GlcNAc) inhibiert werden (Prehm, 1985; Sauer, 1991). In Anlehnung an diese Befunde konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß auch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch o-UDP-GlcNAc inhibiert wird.

Die Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch o-UDP-GlcNAc erfolgt durch spezifische Bindung des Inhibitors ans aktive Zentrum des Enzyms. Eine ähnlich gute Inhibition der Enzymaktivität wie durch o-UDP-GlcNAc läßt sich mit o-UDP erzielen. Dies macht deutlich, daß dem Nukleotid-Rest bei der Substraterkennung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase eine entscheidende Rolle zukommt, während der Zucker-Rest eine eher untergeordnete Rolle spielt. Auch durch andere oxidierte Nukleotide, wie o-ADP läßt sich die UDP-GlcNAc-2-Epimerase inhibieren, jedoch schlechter als durch o-UDP oder o-UDP-GlcNAc. Adenosin ist eine Purin-Base und damit räumlich wesentlich anspruchsvoller als die Pyrimidin-Base Uridin. ADP bindet zwar schlechter als UDP aber immer noch recht gut ans aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Das bedeutet, daß das kleinere UDP zwar bevorzugt an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet, das aktive Zentrum aber auch genügend Platz für die Bindung von ADP hat, d.h. an der Stelle, wo die Bindung der Heteroaromaten erfolgt, relativ geräumig ist.

Es konnte gezeigt werden, daß o-UDP-GlcNAc und o-UDP ähnlich gut an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase binden, d.h. der Zuckeranteil bei der Bindung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Bei einer weiteren Reduktion der Nukleotide auf Nukleoside ist nahezu keine Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mehr nachzuweisen. Damit wird deutlich, daß nicht der Base, sondern den beiden Phosphatgruppen mit ihren zwei negativen Ladungen die entscheidende Rolle bei der Substraterkennung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase zukommt.

Um die Spezifität der Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung von o-UDP-GlcNAc und o-UDP auf die UDP-Galactose-4-Epimerase, die auch UDP-GlcNAc als Substrat akzeptiert, untersucht. Während für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der UDP-Anteil, vermutlich die Phosphatgruppen, eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung spielt, ist für die UDP-Galactose-4-Epimerase der Zuckeranteil des Substrates von großer Bedeutung. Deshalb wird die UDP-Galactose-4-Epimerase von o-UDP-GlcNAc wesentlich besser inhibiert als von o-UDP. 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.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität wird durch die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate im mikromolaren Bereich inhibiert, wobei die ManNAc-Kinase-Aktivität nicht weiter beeinflußt wird. Damit muß es für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität und die ManNAc-Kinase-Aktivität zwei getrennte aktive Zentren geben, wie sie bereits von Effertz *et al.* (1999) postuliert wurden. Bei hohen mikromolaren Konzentrationen wird auch die ManNAc-Kinase-Aktivität von diesen Substanzen blockiert, wobei o-ADP der effektivste Inhibitor ist. Damit läßt sich auch die ManNAc-Kinase spezifisch durch

oxidierte Nukleotid-Derivate inhibieren. Jedoch sind für die Inhibition dieser Enzymaktivität etwa 40-fach höhere Inhibitorkonzentrationen als für die Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase nötig. Damit sind die Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase und der ManNAc-Kinase zwei unabhängige getrennte Ereignisse.

Bei der Oxidation der UDP-GlcNAc-Derivate entstehen Dialdehyde. Aufgrund dieser reaktiven Aldehydgruppen wirken die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate als irreversible Inhibitoren. Vermutlich reagieren sie unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit Aminosäuren des Enzyms, z.B. mit dem primären Amin eines Lysins. Von Dialdehyden ist bekannt, daß sie als Crosslinker wirken. Eine crosslinkende Wirkung konnte auch für die oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate nachgewiesen werden. In millimolaren Konzentrationen vernetzen diese Substanzen die Untereinheiten der hexameren UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Zunächst werden Trimere detektiert, die dann später weiter zu Hexameren vernetzt werden. Allerdings konnten trimere Strukturen im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Expression der Deletionsmutanten detektiert werden. Auch bei der Expression verschiedener Punktmutanten wurden früher bereits Trimere nachgewiesen (Effertz *et al.*, 1999). Dimere, wie sie bei der Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenleber detektiert wurden, konnten nicht beobachtet werden.

Bevor die Trimere der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu Hexameren vernetzt werden, tritt kurzzeitig ein Intermediat auf, vermutlich ein Pentamer. Wie es zur Bildung derartiger Pentamere kommen kann, ohne daß Dimere nachgewiesen werden, konnte nicht geklärt werden. Jedoch zeigten auch Punktmutationen der Histidine 110 und 132 einen geringfügig kleineren oligomeren Zustand als das hexamere Wildtypprotein (Effertz *et al.*, 1999). Eventuell handelt es sich bei diesen oligomeren Strukturen auch um Pentamere. Auch bei den Deletionsmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurden kleinere oligomere Strukturen als die erwarteten Hexamere gefunden. Es kann spekuliert werden, daß es sich auch hier zum Teil um Pentamere handelt, die sich im verbreiterten Elutionspeak der Hexamere verbergen.

4.4 Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch weitere Inhibitoren

In der Arbeitsgruppe Schmidt/Universität Konstanz wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre inhibitorische Wirkung auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase untersucht wurden. Wie sich bereits bei den Sialyltransferasen gezeigt hatte (Müller *et al.*, 1998), konnte auch bei potentiellen Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase der Zucker-Rest gut durch leichter

zugängliche Aromaten ersetzt werden. Jedoch haben Substituenten am Aromaten einen großen Einfluß auf die Bindung an das Enzym. Aus diesen Beobachtungen kann für die Synthese weiterer Inhibitoren abgeleitet werden, daß sich an der Position des Zucker-Restes vorteilhafterweise ein hydrophober Rest mit einer polaren Gruppe befinden sollte. Gleichzeitig kann aus diesen Werten geschlossen werden, daß der Zucker-Anteil nur eine geringe Rolle bei der Erkennung und Bindung des Substrates an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase spielt. Diese Befunde werden durch die NMR-Untersuchungen an dem Enzym und durch die etwa ähnliche Inhibition des Enzyms durch o-UDP und o-UDP-GlcNAc bestätigt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten STD-NMR-Untersuchungen haben gezeigt, daß das Zwischenprodukt der Epimerisierungsreaktion von UDP-GlcNAc zu ManNAc, das 2-Acetamidoglucal, nahezu nicht an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet. Für Derivate des 2-Acetamidoglucals konnte deshalb auch keine nennenswerte Inhibition der Epimeraseaktivität detektiert werden. Eine Ausnahme bildet das 2-Acetamidoglucal-Derivat mit einer Carboxylgruppe am C-1. Durch das Einführen einer negativen Ladung bindet diese Struktur sehr gut an das Enzym. Ähnliche Erkenntnisse konnten aus STD-NMR-Untersuchungen von GlcNAc und GlcNAc-1-Phosphat gewonnen werden. GlcNAc-1-Phosphat bindet noch recht gut an das Enzym, während GlcNAc gar nicht mehr an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet. Diese Beobachtungen machen deutlich, daß die Anwesenheit einer negativen Ladung die Bindung an das Enzym stark erhöht. Auch o-Uridin bindet kaum an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase, während UDP sehr gut bindet.

Werden 2-Acetamidoglucal-Derivate mit einem UDP-Rest gekoppelt, so inhibieren die resultierenden Strukturen die Epimeraseaktivität besser als die einfachen 2-Acetamidoglucal-Derivate. Somit sind für eine gute Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mindestens eine, besser sogar zwei negative Ladungen erforderlich. Die räumliche Anordnung dieser Ladungen ist dabei jedoch in gewissen Grenzen flexibel. So zeigen UMP-Derivate mit einer Phosphonatgruppe sogar eine bessere Hemmung der Epimeraseaktivität als UDP-Derivate. Eine etwas veränderte Geometrie der beiden Phosphatgruppen sollte demnach zu effektiven Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase führen.

Zusammenfassend kann aus der biochemischen Charakterisierung der bisher getesteten Inhibitoren abgeleitet werden, daß weitere potentielle Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf jeden Fall zwei negative Ladungen enthalten sollten. Die geometrische Anordnung dieser Ladungen ist dabei jedoch geringfügig variabel und kann die Effektivität eines Inhibitors stark beeinflussen. Für eine einfachere Synthese kann der Zucker-Rest durch leichter zugängliche Aromaten mit einer polaren Gruppe

ersetzt werden. Auf dieser Basis sollte es in naher Zukunft möglich sein, effektive Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu synthetisieren.

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

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 der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mit verschiedenen Substanzen zu gewinnen.

Das Bindungsepitop von UDP-GlcNAc, dem natürlichen Substrat der UDP-GlcNAc-2-Epimerase zeigt, daß dem UDP-Rest im Molekül die entscheidende Rolle bei der Bindung ans Enzym zukommt. Die Protonen des Zucker-Anteils hingegen weisen einen relativ großen Abstand zur Proteinoberfläche auf, sind also nicht so entscheidend für die Bindung des Substrates ans Enzym. Diese Ergebnisse werden durch die Inhibitionsversuche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mit o-UDP-GlcNAc und o-UDP bestätigt. In diesen Versuchen konnte nahezu kein Unterschied in der Inhibition des Enzyms durch o-UDP bzw. o-UDP-GlcNAc nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß der Zucker bei der Bindung bzw. Erkennung des Substrates nahezu keine Rolle spielt. Zudem zeigen verschiedene, chemisch synthetisierte UDP-GlcNAc-Derivate, bei denen der Zucker-Anteil durch einen Aromaten ersetzt wurde, eine ähnliche gute bzw. z.T. sogar bessere Bindung an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase als das natürliche Substrat UDP-GlcNAc.

Die entscheidende Rolle bei der Bindung von UDP-GlcNAc an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase scheinen die beiden Phosphatgruppen zu spielen. Bereits die Abspaltung der β -Phosphatgruppe des UDP verringert die Bindung ans Enzym stark. Inhibitionsversuche mit o-Uridin haben gezeigt, daß Uridin kaum noch an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase bindet. Damit müssen Liganden der UDP-GlcNAc-2-Epimerase mindestens zwei negativ geladene Gruppen tragen, um gut an das Enzym zu binden. Die räumliche Anordnung dieser beiden negativ geladenen Gruppen ist jedoch in gewissen Grenzen flexibel. So konnten verschiedene UDP-GlcNAc-Derivate als Phosphonate mit einer etwas veränderten Geometrie synthetisiert werden, beispielsweise **I32**. Derartige Phosphonate binden z.T. wesentlich besser an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase als das natürliche Substrat UDP-GlcNAc. Dies ist vermutlich in der veränderten Geometrie begründet, die einem postulierten Übergangszustand bei der Abspaltung des UDP-Restes sehr nahe kommen sollte.

STD-Experimente von ManNAc mit der ManNAc-Kinase haben gezeigt, daß nur das α -Anomer an die ManNAc-Kinase bindet. Obwohl eine gewisse Selektivität des Enzyms durchaus erwartet ist, ist es ungewöhnlich, daß keine Bindung des β -Anomers nachgewiesen werden konnte. Diese starke Selektivität der ManNAc-Kinase für α -ManNAc wird verständlicher, wenn man bedenkt, daß die ManNAc-Kinase ihr Substrat vermutlich nicht aus einem zellulären ManNAc-Pool, sondern direkt von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase erhält. Durch Arbeiten von Chou *et al.* (2003) und im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase reines

α -ManNAc bildet. Da die Anomerisierung zu β -ManNAc bei 37 °C etwa 10 min benötigt (Chou *et al.*, 2003), sollte die ManNAc-Kinase aufgrund ihrer Nähe zur UDP-GlcNAc-2-Epimerase reines α -ManNAc als Substrat erhalten. Durch die Zusammenlagerung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase und der ManNAc-Kinase konnte dann im Laufe der Evolution die ManNAc-Kinase-Reaktion immer weiter selektiv für die Phosphorylierung von α -ManNAc optimiert werden. Dadurch zeigt die ManNAc-Kinase zum heutigen Zeitpunkt eine derartig starke Selektivität für α -ManNAc.

Für verschiedene ManNAc-Derivate konnte gezeigt werden, daß sie von Zellen in Sialinsäuren eingebaut und anschließend in verschiedenen Glycostrukturen exprimiert werden (Keppler *et al.*, 2001). Dies kann verschiedene biochemische Prozesse stark beeinflussen. So sind beispielsweise Polyomaviren nicht mehr in der Lage, an Rezeptoren mit derartigen modifizierten Sialinsäuren zu binden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die ManNAc-Kinase auch ManNProp, ManNBut und GlcNAc als Substrate akzeptiert und phosphoryliert, jedoch wesentlich schlechter als ManNAc. STD-NMR-Untersuchungen haben gezeigt, daß dies zum einen in einem veränderten Bindungsepitop, zum anderen in verschiedenen K_D -Werten begründet ist. So haben GlcNAc und ManNAc zwar ähnliche K_D -Werte, binden also ähnlich gut an die ManNAc-Kinase, zeigen jedoch ein stark unterschiedliches Bindungsepitop. Aufgrund dieses geänderten Bindungsepitops wird GlcNAc wesentlich schlechter durch die ManNAc-Kinase phosphoryliert als ManNAc. Für GalNAc, das C-4 Epimer von ManNAc, konnte gezeigt werden, daß es überhaupt nicht an die ManNAc-Kinase bindet. Daraus muß gefolgert werden, daß die Geometrie am C-4 genauso wichtig für die Bindung des Substrates an das Enzym ist wie die Geometrie des C-1. Zusammenfassend kann damit für die Bindung von Zuckern an die ManNAc-Kinase festgehalten werden, daß die Stereochemie am C-1 und C-4 essentiell für die Bindung an das Enzym ist, während die Stereochemie am C-2 nur die Bindung des Substrates modifiziert.

ManNAc und ManNProp zeigen, abgesehen von der NHAc- bzw. NHProp-Gruppe, nahezu identische Bindungsepitope. Die K_D -Werte sind jedoch sehr unterschiedlich, d.h.

die beiden Substanzen binden verschieden gut an die ManNAc-Kinase. Somit können die unterschiedlichen Reaktivitäten der beiden Substanzen gut durch eine Änderung der Bindungskonstanten aufgrund der unterschiedlichen Bindung der NHAc- bzw. des NHProp-Restes erklärt werden. ManNBut hingegen zeigt ein stark verändertes Bindungsepitop. Dies läßt vermuten, daß ManNBut nicht in der gleichen Weise an die ManNAc-Kinase bindet wie ManNProp, obwohl beide etwa gleiche Bindungskonstanten haben. Somit ist die niedrigere Umsatzrate von ManNBut auf ein verändertes Bindungsepitop zurückzuführen. Daß die Bindungsepitope, wie auch die K_D -Werte, durch Modifikationen der NHAc-Gruppe verändert werden können, stimmt mit biologischen Studien überein. Dort konnte gezeigt werden, daß die Art der Seitenketten am Stickstoff einen erheblichen Einfluß auf die Umsatzzraten im Enzym hat.

Viele bekannte Kinasen benötigen Mg^{2+} als essentielles Kation für ihre Enzymreaktion (Bork *et al.*, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die ManNAc-Kinase auch in Abwesenheit von Mg^{2+} aktiv ist. Werden jedoch geringe Mengen Mg^{2+} dem Puffer zugegeben, so steigt die Aktivität auf das 15-fache an. Zudem konnte eine Änderung des Bindungsepitops von ATP detektiert werden. Besonders die Protonen, die sich in der Nähe der Phosphatgruppen befinden, zeigen größere Änderungen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Bindung von Mg^{2+} an ATP die Bindung dieses Substrates an die ManNAc-Kinase und so die Phosphorylierungsreaktion stark begünstigt. Für genauere Aussagen müssen jedoch noch weitere Experimente durchgeführt werden. Lowe und Potter (1981) bzw. Pollard-Knight *et al.* (1982) nehmen für die Hexokinase und die Glucokinase an, daß Mg^{2+} die negativen Ladungen der β - und γ -Phosphatgruppen des ATP schützt und dadurch den nukleophilen Angriff der OH-Gruppe des Zuckers auf das γ -Phosphat stark begünstigt.