

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sowohl in prokaryontischen, als auch in eukaryontischen Zellen als aktives Protein zu exprimieren. Jedoch wurde sowohl bei der Expression in Bakterien als auch in Hefen und Insektenzellen jeweils ein großer Anteil des überexprimierten Proteins in hochmolekularen Aggregaten gefunden. Nur in Insektenzellen konnte lösliches aktives Enzym in Milligrammengen pro Liter exprimiert werden.

Um die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase biochemisch zu charakterisieren, wurde ein Reinigungsschema erarbeitet, nach dem das relativ instabile Enzym in möglichst kurzer Zeit zu reinigen ist. Dies gelang letztlich mit einem His-Tag-Fusionsprotein, das mittels Nickel-NTA-Agarose-Chromatographie und anschließender Gelfiltration bis zu Homogenität gereinigt werden konnte.

Die beiden Aktivitäten des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase konnten getrennt voneinander exprimiert werden; jedoch führt dieses zu einem starken Aktivitätsverlust der jeweils noch vorhandenen Domäne. Die Domänen lassen sich demnach zwar noch getrennt exprimieren, beeinflussen sich in ihren Aktivitäten aber stark. Außerdem konnte durch verschiedene Deletionsmutanten des Enzyms gezeigt werden, daß sowohl N-terminale als auch C-terminale Deletionen zu einer Änderung des oligomeren Zustandes führen. Beim Wildtyp und bei kleinen Deletionen wurden hauptsächlich Hexamere nachgewiesen, bei größeren Deletionen überwiegen trimere Strukturen.

Um die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase weiter zu charakterisieren und die Suche nach Inhibitoren zu erleichtern, wurden die folgenden oxidierten UDP-GlcNAc-Derivate synthetisiert: o-UDP-GlcNAc, o-UDP, o-ADP, o-GDP, o-Uridin und o-Methylribosid. Diese Substanzen hemmen die Epimeraseaktivität in der aufgeführten Reihenfolge sehr effektiv und spezifisch. Jedoch handelt es sich um eine irreversible Hemmung, da es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Enzym und Inhibitor kommt. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, daß für eine gute Inhibierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität ein Uridin mit zwei negativ geladenen funktionellen Gruppen nötig ist, beispielsweise o-UDP oder o-UDP-GlcNAc. Bei der ManNAc-Kinase-Aktivität zeigt nur o-ADP eine nennenswerte Hemmung der Enzymaktivität. Dies belegt, daß das Enzym zwei getrennte aktive Zentren aufweist, die unabhängig voneinander arbeiten. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Deletionsmutanten kann gefolgert werden, daß die beiden aktiven Zentren in unterschiedlichen Domänen lokalisiert sind.

Verschiedene Derivate des Substrates bzw. des Übergangszustandes der Epimerasereaktion, des Intermediates 2-Acetamidoglucal, oder des natürlich vorkommenden Inhibitors CMP-Neu5Ac wurden auf ihre hemmende Wirkung untersucht. Gleichzeitig wurde mittels STD-NMR-Spektroskopie analysiert, wie natürliche Liganden mit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase interagieren, insbesondere wurden Bindungsepitope ermittelt. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche zusammen mit den NMR-Untersuchungen lassen Rückschlüsse zu, warum bestimmte Substanzen die Enzymaktivität recht gut inhibieren und andere weniger gut. Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich danach folgendes vorläufiges Model für einen guten Inhibitor: ein Uridin- oder Cytidin-Nukleotid, das über eine Brücke mit zwei negativen Ladungen mit einem unpolaren Ring mit mindestens einem polaren Substituenten gekoppelt ist. Diese Informationen sind eine gute Basis für die Synthese weiterer Inhibitoren für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase.

5.1 Synopsis

In this work it has been shown that it is possible to express active rat UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase in both pro- and eukaryotic cells. In the case of bacterial and yeast based expression systems the significant majority of the expressed protein was produced as high molecular weight aggregates. Only in the case of insect cells has it proven possible to overexpress milligram quantities of soluble active protein per litre.

To facilitate the biochemical characterisation of the enzyme, which is known to be relatively unstable, the purification was optimised to be as rapid as possible. Purification to homogeneity was achieved in the end by the expression of the protein as a His-tag fusion followed by nickel-chelate chromatography and gel filtration.

The two activities of the bifunctional enzyme UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase can be separated albeit with a significant loss of activity. This suggests that the two domains influence one another whilst possessing separate functionality. In addition through the use of deletion mutants it has been possible to investigate the oligomeric state of the enzyme. Deletion at either the N or C terminus leads to a change in the oligomeric state, with a preference for a trimeric state with larger deletions and the native hexameric with smaller.

To further characterise UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase and in order to facilitate the design of inhibitors, the following inhibitors were synthesised and their activity investigated: *o*-UDP-GlcNAc, *o*-UDP, *o*-ADP, *o*-GDP, *o*-uridine and *o*-methylriboside. The inhibitors were found to have an effectivity and specificity in the order given. Therefore, to have a higher inhibition of the epimerase activity a uridine in conjunction with two negatively charged groups as in *o*-UDP and *o*-UDP-GlcNAc is required. In the case of the kinase activity only *o*-ADP demonstrated significant inhibitor activity suggesting that the two active sites are distinct and with the results of the deletion mutants localised in different domains.

Inhibitors were synthesised based on the structures of the substrate, the epimerase intermediate, 2-acetamidoglucal and the naturally occurring inhibitor, CMP-Neu5Ac and examined with respect to their ability to inhibit the enzyme. With the use of STD-NMR the interaction of natural ligands with the enzyme was examined, with an emphasis on the binding epitope. The results of the inhibitor screening, together with those of the NMR investigation have allowed the drawing of conclusions as to why some compounds function well as inhibitors and other not. The preliminary model for good inhibition derived from this work is that of a uridine or cytidine nucleotide, attached via a spacer containing two negatively charge groups, to a non-polar ring possessing at least one polar substituent. This information is essential in the future design of drugs targeted towards the UDP-GlcNAc 2-epimerase.

