

**Identifizierung, funktionelle Expression und
biochemische Charakterisierung von Isoformen der
UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/
N-Acetylmannosaminkinase**

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

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



**vorgelegt von
Stefan Reinke
aus Berlin
Dezember 2007**

**Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Arnimallee 22
14195 Berlin-Dahlem**

**Die Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Stephan Hinderlich angefertigt.
Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von August 2004 bis
September 2007 im Institut für Biochemie und Molekularbiologie in Berlin
(AG Reutter/AG Hinderlich) durchgeführt.**

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Reinke, S. O., Hinderlich, S. (2007) Prediction of three different isoforms of the
human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase.
FEBS Lett. 581, 3327-3331**

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Stephan Hinderlich**
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Volker Haucke**

Disputation am: 29.02.2008

Für Vanessa
Schön, daß es Dich gibt!

Danksagung

Eine solche Arbeit kann nicht das Produkt eines Einzelnen sein. Daher möchte ich all jenen, deren Mithilfe zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beitrug, an dieser Stelle Dank sagen.

Als erstes möchte ich mich vielmals bei **Professor Dr. Stephan Hinderlich** für die Betreuung dieser Arbeit und die vielen anregenden Diskussionen bedanken. Ohne seine Geduld, seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Hilfsbereitschaft vor allem auch in schwierigeren Zeiten wäre eine Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen.

Professor Dr. Werner Reutter danke ich dafür, daß er mir die Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut ermöglicht hat. Er war jederzeit ansprechbar und zeigte reges Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit.

Professor Dr. Volker Haucke danke ich dafür, daß er sich bereit erklärt hat, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Bei **Professor Dr. Christian Bauer** möchte ich mich für seine Unterstützung in den letzten Semestern bedanken.

Dr. Markus Berger, Dr. Darius Ghaderi und **Felista Tansi** danke ich für die konstruktiven Diskussionen und die insgesamt sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Der mitmenschliche Umgang trug zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit bei.

Weiterhin danke ich **Christiane Kilian**, von deren langjähriger Erfahrung in der Zellkultur ich sehr profitiert habe, und **Katrin Büttner** für ihre hilfreiche technische Assistenz bei Sequenzierungsarbeiten.

Bei Frau **Felicitas Kern** möchte ich mich für ihre Hilfe in allen germanistischen Belangen bedanken.

Darüberhinaus gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern und Praktikanten der Arbeitsgruppe Reutter, die mich bei meiner Arbeit begleitet haben.

Meine Eltern **Christiane und Olaf Reinke**, meine Brüder und meine Freunde, standen mir stets hilfreich zur Seite und haben mich und mein Vorhaben tatkräftig unterstützt, wo immer sie konnten. Dafür danke ich Ihnen herzlich.

Auch für ihre Unterstützung und Hilfe, ihren Beistand und für ihren nicht zu unterschätzenden Rückhalt möchte ich mich bei **Vanessa Frenz**, einem ganz besonderen Menschen, sehr herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
I Einleitung	6
1.1. Struktur der Sialinsäuren	7
1.2. Vorkommen von Sialinsäuren	11
1.3. Sialylierte Oligosaccharidstrukturen	13
1.3.1. Glycoproteine	13
1.3.2. Glycolipide	17
1.4. Biologische Funktion von Sialinsäuren	18
1.4.1. Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion	18
1.4.2. Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene	22
1.4.3. Sialinsäuren als Masken antigener Determinanten	25
1.4.4. Einfluß von Sialinsäuren auf Struktur und Funktion von Glycokonjugaten	25
1.4.5. Sialinsäuren und Carcinome	27
1.5. Aminosäurestoffwechsel	28
1.5.1. Biosynthese von UDP-GlcNAc	28
1.5.2. Biosynthese von Sialinsäuren	29
1.6. Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese	31
1.7. GNE-Isoformen	33
1.8. Pathobiochemie der GNE	35
1.8.1. Sialurie	35
1.8.2. Erbliche Einschlusskörperchenmyopathie	35
II Zielsetzung der Arbeit	40
III Ergebnisse	42
3.1. Expression und biochemische Charakterisierung neuer GNE-Isoformen	42
3.1.1. Identifizierung der Primärstrukturen der humanen GNE-Isoformen	42
3.1.2. Analyse von GNE-Isoformen aus nicht-humanen Spezies	43
3.1.3. Gewebeverteilung von humaner und muriner GNE-codierender mRNA	45
3.1.4. Expression der GNE-Isoformen in Insektenzellen mit dem BAC-TO-BAC [®] - Baculovirussystem	48
3.1.4.1. Klonierung der humanen und murinen GNE-Isoform-codierenden cDNAs	48
3.1.4.2. Generierung des Baculovirus und Pilotexpression	50
3.1.4.3. Expression und Reinigung der humanen und murinen GNE-Isoformen	52
3.1.5. Charakterisierung der humanen und murinen GNE-Isoformen	57

Inhaltsverzeichnis

3.1.6. Transiente Proteinexpression in GNE-defiziente <i>CHO</i> -Lec3-Zellen	61
3.1.7. Stabile Transfektion von <i>BJA-B</i> K20-Zellen und Etablierung GNE-Isoformen-spezifischer Zelllinien	62
3.1.8. Expression und Charakterisierung eines GNE2-Hybridproteins	66
3.2. Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der GNE	68
3.2.1. Valosin-Containing-Protein (VCP, p97)	68
3.2.2. Expression und Reinigung des humanen VCP-Proteins	68
3.2.3. <i>Pull-down</i> -Versuche mit GNE und VCP	69
3.2.4. Co-Transfektion von Insektenzellen mit VCP und hGNE1	72
3.2.5. Analyse der Interaktion zwischen human VCP und GNE mittels Co-Immunpräzipitation	74
3.2.6. Oxidation Resistance Protein 1 (Oxr1)	76
3.2.7. Klonierung der humanen Oxr1-cDNA	77
3.2.8. Expression und Reinigung der humanen Oxr1-Isoformen	78
3.2.9. <i>Pull-down</i> -Versuche mit GNE und Oxr1	81
IV Diskussion	84
4.1. Identifikation neuer GNE-Isoformen und Analyse ihrer spezifischen Gewebsverteilungen	86
4.2. Klonierung, Expression und Reinigung der humanen und murinen GNE-Isoformen	87
4.3. Charakterisierung der humanen und murinen GNE-Isoformen	89
4.4. Protein-Protein-Interaktionen	94
V Zusammenfassung	98
VI Summary	99
VII Material und Methoden	100
7.1. Materialien	100
7.1.1. Chemikalien	100
7.1.2. Zellkulturmaterialien	100
7.1.3. Enzyme	100
7.1.4. Oligonucleotide	100
7.1.5. Antikörper	100
7.1.6. Lektine	101
7.1.7. Kits	101
7.1.8. Vektoren	101
7.1.9. <i>E.coli</i> -Bakterienstämme	101
7.1.10. Insekten-Zelllinien	102
7.1.11. Säuger-Zelllinien	102
7.1.12. Zellkultur	102
7.1.12.1. Bakterien	102
7.1.12.2. Insektenzellen	103
7.1.12.3. Säugerzellen	104

7.2. Geräte	105
7.3. Methoden	106
7.3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	106
7.3.1.1. Bioinformatik	106
7.3.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien	106
7.3.1.3. Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA	107
7.3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	107
7.3.1.5. Agarose-Gelelektrophorese	110
7.3.1.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	111
7.3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten	111
7.3.1.8. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	111
7.3.1.9. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	112
7.3.1.10. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	112
7.3.1.11. Reinigung von DNA	113
7.3.1.12. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	113
7.3.1.13. DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen	114
7.3.1.14. Sequenzierungen	114
7.3.2. Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen	115
7.3.2.1. Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA	115
7.3.2.2. Herstellung von rekombinantem Virus	116
7.3.2.3. Amplifikation von Viren	117
7.3.2.4. Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen	117
7.3.2.5. Plaque-Assay	118
7.3.3. Expression von rekombinanten Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	118
7.3.3.1. Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen	119
7.3.3.2. Expression von rekombinantem Protein in <i>Escherichia coli</i>	119
7.3.4. Transiente Proteinexpression in adhärenenten Säugerzellen	120
7.3.5. Stabile Proteinexpression in Säugerzellen	121
7.3.6. Allgemeine proteinbiochemische Methoden	122
7.3.6.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie	122
7.3.6.2. Glutathion-Affinitätschromatographie	122
7.3.6.3. Proteinbestimmung nach Bradford	123
7.3.6.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	123
7.3.6.5. Coomassie-Färbung von Proteingelen	125
7.3.6.6. Silberfärbung von Proteingelen	125
7.3.6.7. Western-Blotting	125
7.3.6.8. Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen	126
7.3.6.9. UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays	126
7.3.6.10. ManNAc-Kinase-Assay	128
7.3.6.11. Gelfiltrationschromatographie	128
7.3.6.12. Durchflußcytometrie	129

Inhaltsverzeichnis

7.3.6.13. <i>Pull-down</i> -Versuche	130
7.3.6.14. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	131
Literaturverzeichnis	133
Abbildungsverzeichnis	145
Abkürzungsverzeichnis	147
Anhang	149
Oligonucleotidsequenzen	149
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pCR [®] -Blunt-Vektors	152
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pCR [®] 2.1-TOPO-Vektors	153
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pFASTBAC [™] 1-Vektors	154
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pGEX [™] -4T-1-Vektors	155
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pUMVC3-Vektors	155
Vektorkarte und Multiple cloning sites des pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektors	156
Lebenslauf	158