

Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
Charité - Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Reutter

**Das Schlüsselenzym der  
*N*-Acetylneuraminsäurebiosynthese,  
UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase:  
Expression und strukturelle Charakterisierung**

**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  
**Darius Ghaderi**  
aus Mahabad

Berlin-Dahlem, Januar 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin  
unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Reutter durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Kuhl

Tag der Disputation: 27.04.06

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren	1
1.1.1	Struktur von Sialinsäuren	1
1.1.2	Vorkommen von Sialinsäuren	1
1.1.3	Sialylierte Oligosaccharidstrukturen auf Proteinen und Lipiden	3
1.2	Biologische Funktion von Sialinsäuren	4
1.2.1	Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion	4
1.2.2	Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene	6
1.2.3	Maskierung antigener Determinanten durch Sialinsäuren	7
1.2.4	Einfluss von Sialinsäuren auf Struktur und Funktion von Glycokonjugaten und ihrer Träger	7
1.2.5	Sialinsäuren und Karzinome	8
1.3	Biosynthese von Sialinsäuren	9
1.3.1	Biosynthese von CMP-Neu5Ac	11
1.3.2	Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten	12
1.4	Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	13
1.5	Pathobiochemie der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	17
1.5.1	Sialurie	17
1.5.2	Erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM)	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	21
2.1	Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der Ratte (rGNE) mit und ohne Fusionsteil aus Insektenzellen	21
2.1.1	Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der Ratte (rGNE) ohne Fusionsteil mittels des BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystems	21
2.1.2	Expression und Reinigung der His <sub>6</sub> -UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (His <sub>6</sub> -rGNE) aus Insektenzellen	26
2.1.3	Expression und Reinigung des StrepII-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Fusionsproteins (rGNE-Strep) aus Insektenzellen	27
2.2	Charakterisierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mittels biophysikalischer Methoden	29
2.2.1	Charakterisierung des rekombinanten His <sub>6</sub> -rGNE-Proteins mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)	30
2.2.2	Charakterisierung des rekombinanten His <sub>6</sub> -rGNE-Proteins mittels analytischer Ultrazentrifugation	31
2.2.3	Bestimmung des oligomeren Zustands des GNE-Proteins mittels Gelfiltration	39
2.2.3.1	Gelfiltrationsanalyse des gereinigten rekombinanten His <sub>6</sub> -rGNE-Fusionsproteins	39
2.2.3.2	Gelfiltrationsanalyse der gereinigten rekombinanten StrepII-rGNE-Fusionsproteine	40
2.2.3.3	Gelfiltrationsanalyse des rekombinanten rGNE-Proteins	42
2.2.3.4	Gelfiltrationsanalyse des nativen rGNE-Proteins aus Rattenlebercytosol	43
2.2.3.5	Gelfiltrationsanalyse des nativen mGNE-Proteins aus Mäuselebercytosol	45
2.3	Generierung und Charakterisierung von Punktmutanten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase	46

2.3.1	Auswahl der Punktmutanten .....	46
2.3.2	Generierung, Expression und Reinigung der Punktmutanten .....	47
2.3.3	Enzymatische Aktivitäten der Punktmutanten .....	48
2.3.4	Bestimmung der Enzymkinetiken der Punktmutanten .....	49
2.3.5	Gelfiltrationsanalyse der rGNE-Punktmutanten .....	50
2.4	Strukturanalyse des GNE-Proteins.....	52
2.4.1	CD-Spektroskopie des His <sub>6</sub> -rGNE-Wildtyps und der HIBM-Mutanten .....	52
2.4.2	Sekundärstrukturvorhersage des rGNE-Proteins mittels bioinformatischer Methoden.....	53
2.4.3	Fluoreszenzspektroskopie des His <sub>6</sub> -rGNE-Wildtyps und zweier HIBM-Mutanten.....	55
2.4.4	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie des His <sub>6</sub> -rGNE-Fusionsproteins.....	56
2.4.5	Kristallisations-Screening des gereinigten His <sub>6</sub> -rGNE-Fusionsproteins .....	57
2.5	Expression von Domänen des rGNE-Proteins in <i>E.coli</i> .....	58
2.5.1	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne mit GST-Tag.....	58
2.5.2	Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne mit MBP-Tag.....	58
2.5.3	Expression der ManNAc-Kinase-Domäne mit GST-Tag.....	59
2.5.4	Reinigung und Charakterisierung der GST-ManNAc-Kinase-Domäne.....	59
2.5.5	Kristallisation der ManNAc-Kinase-Domäne.....	61
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	63
3.1	Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2- Epimerase/ManNAc-Kinase .....	63
3.2	Struktur und Regulation der rGNE .....	65
3.2.1	Dynamische Lichtstreuung .....	65
3.2.2	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) und Gelfiltration (SEC) .....	66
3.2.3	Sekundär- und Tertiärstruktur des rGNE-Wildtyps sowie von HIBM-Mutanten .....	75
3.3	Analyse des postulierten katalytischen Zentrums der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne von rGNE.....	77
3.4	Charakterisierung und Kristallisation der ManNAc-Kinase-Domäne .....	80
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	83
4.1	Synopsis.....	85
<b>5</b>	<b>Materialien</b> .....	86
5.1	Vektoren .....	86
5.2	Bakterienstämme.....	86
5.3	Insektenzellen .....	86
5.4	Medien und Kultivierung der Zellen.....	86
5.4.1	Bakterien .....	86
5.4.2	Insektenzellen.....	87
5.5	Primer .....	87
5.5.1	Mutageneseprimer .....	87
5.5.2	Sequenzierprimer.....	88
5.5.3	Klonierungsprimer.....	88
5.5.4	Sonstige Primer: .....	89
5.6	Kits .....	89
5.7	Chemikalien .....	89
5.8	Geräte .....	89
<b>6</b>	<b>Methoden</b> .....	90
6.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	90
6.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	90
6.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	90
6.1.3	Reinigung von DNA.....	91

6.1.4	Fällung von DNA .....	91
6.1.5	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	91
6.1.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	91
6.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution .....	92
6.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten .....	92
6.1.9	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	93
6.1.10	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> .....	93
6.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	93
6.1.12	DNA-Sequenzierung.....	94
6.1.13	Herstellung von Punktmutanten .....	95
6.2	Expression in Insektenzellen.....	95
6.2.1	Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA .....	96
6.2.2	Analyse der Bacmid-DNA .....	96
6.2.3	Generierung von rekombinantem Virus.....	96
6.2.4	Amplifikation von Virus .....	97
6.2.5	Bestimmung des Virus-Titers.....	97
6.2.6	Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen.....	98
6.2.7	Virus-Klonierung.....	98
6.3	Expression von rekombinanten Protein in <i>E. coli</i> .....	98
6.3.1	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen.....	98
6.3.2	Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i> im Litermaßstab.....	99
6.4	Allgemeine proteinbiochemische Methoden .....	99
6.4.1	Proteinbestimmung .....	99
6.4.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	99
6.4.1.2	Proteinbestimmung .....	99
6.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	100
6.4.3	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	101
6.4.4	Silberfärbung von Proteingelen.....	101
6.4.5	UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays .....	101
6.4.5.1	Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay.....	101
6.4.5.2	Colorimetrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay .....	102
6.4.5.3	Gekoppelt optischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay .....	102
6.4.6	ManNAc-Kinase Assays .....	102
6.4.6.1	Gekoppelt optischer ManNAc-Kinase-Assay .....	102
6.4.6.2	Radioaktiver ManNAc-Kinase-Assay: .....	103
6.5	Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ohne Fusionsteil....	103
6.5.1	Salminsulfatpräzipitation .....	103
6.5.2	MonoQ-Chromatographie.....	103
6.5.3	Hydroxylapatit-Chromatographie.....	104
6.5.4	ATP-, ADP-, UDP-Agarose, Blue- und Red-Sepharose .....	104
6.5.5	Phenylsepharose .....	105
6.5.6	Gelfiltration .....	105
6.6	Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit N-bzw. C-terminalen Strep II-Fusionsteil.....	106
6.6.1	StrepTaktin-Chromatographie.....	106
6.7	Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Fusionsteil .....	106
6.7.1	Ni-NTA-Affinitätschromatographie .....	106
6.8	Reinigung von Proteinen mit N-terminalen GST-Tag .....	107
6.8.1	Glutathion-Affinitätschromatographie.....	107
6.8.2	Abspaltung des GST-Fusionsteils .....	107

6.8.2.1	On-Column-Cleavage .....	107
6.8.2.2	Off-Column-Cleavage.....	107
6.9	Reinigung von Proteinen mit N-terminalen MBP-Tag .....	108
6.10	Biophysikalische Methoden.....	108
6.10.1	Gelfiltration .....	108
6.10.2	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ).....	108
6.10.2.1	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf.....	109
6.10.2.2	Sedimentationsgleichgewichtslauf.....	110
6.10.3	Dynamische Lichtstreuung .....	111
6.10.4	CD-Spektroskopie .....	112
6.10.5	Fluoreszenzspektroskopie .....	112
6.11	Kristallisations-Screening.....	113
6.11.1	His <sub>6</sub> -UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Kristallisations-Screening.	113
6.11.2	ManNAc-Kinase-Kristallisations-Screening .....	114
6.12	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM).....	114
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	115
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	129
	Abkürzungsverzeichnis .....	129
	GNE-Proteinsequenzen der Deuterostomia .....	130
	Veröffentlichungen .....	134
	Lebenslauf .....	136
	Danksagung .....	137