

4 Zusammenfassung

UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. Ihre funktionelle Expression ist in der frühen Embryogenese essentiell und spielt in der Synthese von Zellerkennungsmotiven im adulten Organismus eine tragende Rolle. Weiterhin lassen sich die Erbkrankheiten Sialurie und erbliche Einschlusskörperchenmyopathie auf Mutationen im GNE-Gen zurückführen. Für ein besseres Verständnis des bifunktionellen Enzyms werden mg-Mengen von aktivem, gereinigtem Protein benötigt. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals solch große Proteinmengen mit dem BAC-TO-BACTM-Baculovirus-Expressionssystem in Sf900-Insektenzellen exprimiert und mit Hilfe eines N-terminalen His₆-Fusionsteils gereinigt werden. Auch ohne Fusionsteil bzw. mit einem StrepII-Fusionsteil gelang die Expression und Reinigung aktiver rGNE, jedoch war die Ausbeute an Protein wesentlich geringer. Des Weiteren gelang es erstmals, mg-Mengen der separierten ManNAc-Kinase-Domäne funktionell zu exprimieren und zu reinigen. Die gereingte ManNAc-Kinase-Domäne bildet ausschließlich Dimere und ist mit einer spezifischen Aktivität von 13 U/mg gegenüber dem Gesamtzym um den Faktor 7 aktiver. Grund für diese Diskrepanz ist möglicherweise die schlechte Zugänglichkeit von freiem ManNAc beim Wildtyp, die von der Epimerase-Domäne hervorgerufen wird. Mit gereinigter ManNAc-Kinase konnten erste Proteinkristalle gezüchtet werden, die kubisch waren und eine Kantenlänge von 0,02 mm aufwiesen.

Untersuchungen des gereinigten His₆-rGNE-Fusionsproteins mittels dynamischer Lichtstreuung zeigten eine oligomodale Proteinlösung mit einer vorwiegend tetrameren Quartärstruktur des GNE-Proteins. Gelfiltrationsläufe mit nativer GNE aus Ratten- und Mäuselebercytosol, rekombinanter GNE ohne bzw. mit Fusionsteil bekräftigten eine tetramere Struktur des bifunktionellen Enzyms. Analytische Ultrazentrifugationsexperimente konnten dies weiter erhärten. Die experimentellen Daten ließen sich am Besten mit einer Monomer-Dimer-Tetramer-"nicht äquilibrierbare Aggregate"-Assoziation beschreiben. Das Tetramer wird synergistisch durch den Inhibitor CMP-Neu5Ac und das Substrat UDP-GlcNAc stabilisiert, was auf unabhängige Bindungsstellen für die Liganden schließen lässt. Zusätzlich kann in Anwesenheit von UDP-GlcNAc kein Dimer beobachtet werden.

Punktmutationen im postulierten aktiven Zentrum der Epimerasedomäne von GNE reduzieren die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität, lassen aber die ManNAc-Kinase-Aktivität unbeeinflusst. Lys24 und His220 spielen für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität eine tragende Rolle, die Aminosäuren Asp112, Glu134 und Asp143 sind für die Aktivität sogar

essentiell. Enzymkinetische Analysen der Punktmutanten belegen, dass Lys24 und His220 eher für die Substratbindung als für die eigentliche katalytische Reaktion verantwortlich ist. Punktmutationen der Aminosäuren Asp112 und Glu134 führen zu dimeres GNE-Protein, was auf eine gestörte Oligomerisierungsstelle innerhalb der Epimerasedomäne hinweist.

4.1 Synopsis

UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase is the key enzyme of sialic acid biosynthesis in mammals. Its functional expression is a prerequisite for early embryogenesis and for the syntheses of several cell recognition motifs in the adult organism. This bifunctional enzyme is involved in the development of different diseases like sialuria or hereditary inclusion body myopathy. For a detailed understanding of the enzyme, large amounts of homogenous active protein are needed. In this work mg amount of active rat UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (rGNE) could be functionally expressed in Sf900 insect cells by using the BAC-TO-BACTM Baculovirus expression system for the first time. Purification of rGNE was performed with His₆-Tag, StrepII-Tag and without any tag, where highest protein amounts were obtained with a N-terminal His₆-Tag. Furthermore the ManNAc kinase domain of rGNE was expressed in *E.coli* and purified to homogeneity. It assembles as a dimer, and the ManNAc kinase active site seems to be more accessisable in the absence of the UDP-GlcNAc 2-epimerase domain, indicated by a 7-fold higher specific kinase activity compared to the complete rGNE protein. Finally cubic ManNAc kinase crystals with diameter of 0,02 mm were generated.

Predominantly tetrameric rGNE was observed by dynamic light scattering analysis. Size exclusion chromatography experiments with native rat and murine GNE, recombinant rat GNE with and without fusion protein showed that the bifunctional enzyme is a tetramer. Analytical ultracentrifugation experiments confirmed the tetrameric state of rGNE. Best fit model for sedimentation equilibrium experiments is a monomer-dimer-tetramer-, „non-equilibrating-aggregates“ association. The tetramer can be stabilized synergistically by the CMP-Neu5Ac and UDP-GlcNAc indicating independent binding sites for both ligands. Additionally in the presence of UDP-GlcNAc, no dimer was observed.

Mutations of amino acids potentially localized in the active site of the UDP-GlcNAc 2-epimerase domain do not or only little affect the ManNAc kinase activity of the bifunctional enzyme, but strongly influence the UDP-GlcNAc 2-epimerase activity. Mutations of the carboxyl groups of D112, E134 and D143 completely abolished UDP-GlcNAc 2-epimerase activity, the K24A and H220N mutation displayed 8% and 57%, respectively, residual epimerase activity. Kinetic measurements revealed an almost 2-fold increase of the K_m value for UDP-GlcNAc for the mutants K24A and H220N, suggesting that His220 and Lys24 are more responsible for the ligand binding and less for the catalytic mechanism. The rGNE point mutants D112N and E134Q assemble to dimers indicating a disturbed oligomerisation site in the epimerase domain.