

3 Diskussion

Diese Arbeit untersucht mögliche Regulationsmechanismen und die Funktion der GNE unabhängig von ihrer Funktion in der Sialinsäurebiosynthese, da GNE-defiziente Mäuse eine frühe embryonale Lethalität zeigen und an Embryonaltag 8,5 sterben (Schwarzkopf et al 2002). Eine Krankheit, die durch vermehrtes Ausscheiden von Sialinsäuren mit dem Urin gekennzeichnet ist, ist die Sialurie. Diese Krankheit beruht auf einem Defekt in der Feedback-Inhibition der GNE verursacht durch eine Mutation in dem Gen der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (*gne*) (Seppala et al. 1999). Eine weitere Krankheit, die mit Mutationen in der GNE in Zusammenhang gebracht wird, ist die HIBM (Hereditary Inclusion Body Myopathie) (Eisenberg et al. 2001). Der Mechanismus dieser Krankheit ist noch völlig unbekannt. Über die Regulationsmechanismen der Enzymaktivität der GNE ist ebenfalls nur wenig bekannt. Da aber dieses Enzym für die Entwicklung essentiell ist und Sialinsäuren an sich in vielen biologischen Prozessen wie Zell-Zell oder Zell-Matrix Adhäsion, Infektion durch Pathogene oder Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen, ist es daher von großem Interesse mehr über die Regulationsmechanismen oder eventuell vorhandene Interaktionspartner der GNE zu erfahren.

3.1 Oligomerisierung der GNE

Die GNE kann in verschiedenen oligomeren Zuständen vorkommen und zeigt dabei unterschiedliche Enzymaktivitäten. Die Oligomerisierung wird durch Zugabe des Substrates UDP-GlcNAc induziert. In der vorliegenden Arbeit wurden verschieden deletierte Varianten der GNE für ein Y2H-System generiert, um einen Einblick in den Mechanismus der Oligomerisierung des Enzyms zu erhalten. Von den 28 Konstrukten und den daraus resultierenden 196 Kombinationen für das Y2H zeigten nur 3 Konstrukte eine Interaktion miteinander. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinasedomäne für die Interaktion bzw. die Oligomerisierung von sehr großer Bedeutung ist. Mit Konstrukten, die aus kleineren Abschnitten bestanden, konnte keine Interaktion/Oligomerisierung im Y2H nachgewiesen werden. Dies läßt

vermuten, dass zumindest die gesamte Kinasedomäne für die Oligomerisierung benötigt wird. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch Blume et al. 2004 mit Untersuchungen der Enzymaktivität und der oligomeren Zustände von N-terminal und C-terminal deletierten Mutanten der GNE. Die Epimerasedomäne und die Kinasedomäne arbeiten unabhängig voneinander (Effertz et al. 1999). Sowohl die UDP-GlcNAc-Epimerase als auch die ManNAc-Kinase können als separate Domänen exprimiert werden. Obwohl die beiden Enzymaktivitäten unabhängig voneinander sind, geht der Verlust der ersten N-terminalen Aminosäuren 1-39 nicht nur mit dem Verlust der UDP-GlcNAc-Epimeraseaktivität, sondern auch mit einer drastischen Abnahme der ManNAc-Kinaseaktivität einher. Genauso verhält es sich bei C-terminalen Deletionen, die einen Verlust der ManNAc-Kinaseaktivität verursachen und dabei auch die UDP-GlcNAc-Epimerasedomäne beeinflussen (Blume et al. 2004). Diese Effekte kann man damit erklären, daß es eine übergeordnete Regulation auf der Ebene der oligomeren Zustände des Enzyms geben muß, was auch schon vorherige Untersuchungen zur Aktivität und zum oligomeren Zustand des Enzyms zeigten. In der gleichen Arbeit von Blume et al. zeigten Deletionen der letzten 100 Aminosäuren keinen Einfluß auf den hexameren Zustand des Enzyms. Größere Deletionen führten jedoch zu Trimeren. Im Y2H zeigten die Konstrukte, die Aminosäuren 200-500 und 407-660 exprimierten keine positive Reaktion, was im Gegensatz zu den Deletionsstudien zu stehen scheint. Jedoch enthielten im Gegensatz zu den Y2H-Konstrukten die Deletionsmutanten immer den gesamten Epimerase-Teil des Enzyms, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch die Epimerasedomäne einen Einfluß auf den oligomeren Zustand des Enzyms hat. Dies wird teilweise auch durch die Experimente im Y2H bestätigt. Auf Minimalmedium war auch eine positive Reaktion zwischen Konstrukt 1 (gesamtes Enzym) und Konstrukt 2 (nur Epimerasedomäne) erkennbar. Das zwischen kleineren Konstrukten keine positive Reaktion nachgewiesen wurde, liegt vermutlich daran, dass das Y2H-Screening unter sehr stringenten Bedingungen durchgeführt wurde. Um falsch-positive Reaktionen auszuschließen, wurden drei Reportergene simultan verwendet und die Proteinexpression erfolgte auf einem sehr niedrigen Level, so dass keine positive Reaktion im Y2H nicht mit einer negativen Reaktion gleichzusetzen ist. Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Aktivität des Enzyms unter anderem durch seinen oligomeren Zustand reguliert wird und dass es vermutlich nicht eine einzige Oligomerisierungsstelle gibt, sondern dass mehrere Bereiche der

Polypeptidkette für die Bildung von Dimeren, Tetrameren oder Hexameren verantwortlich sind, wobei der Kinasedomäne eine bedeutende Rolle zukommt. Die Ergebnisse des Y2H unterstützen diese Befunde.

3.2 Identifizierung von Bindungspartnern der GNE

Das Y2H-System ist eine gute Methode, um interagierende Proteine zu identifizieren. In einem Screening der 14 verschiedenen *bait* Konstrukte der GNE gegen 5600 Proteine einer fötalen cDNA-Bank von humanem Hirn in einem Matrixformat wurden 4 Proteine als potentielle Interaktionspartner identifiziert: das Collapsin Response Mediator Protein 1 (CRMP1), das Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein (PLZF), der Receptor Interacting Factor 1 (RIF1) und das bisher noch unbekannte Protein KIAA1549. Die Interaktionen von PLZF und RIF1 mit der GNE waren am deutlichsten mit dem Konstrukt 1, das aus dem gesamten Enzym bestand, wohingegen die Interaktion von KIAA1549 und CRMP1 mit der GNE am besten mit dem Konstrukt 3 waren, das die Kinasedomäne repräsentiert. Auch bei diesem Screening ergaben alle kleineren Varianten des Enzyms keine positiven Reaktionen. Das kann zum einen an den sehr stringenten Versuchsbedingungen liegen oder daran, dass für die Interaktion entweder die gesamte GNE oder zumindest die komplette Kinasedomäne erforderlich sind. Die Interaktion von CRMP1 und der GNE konnte im Y2H sogar mit zwei leicht unterschiedlichen Klonen nachgewiesen werden. Da die beiden Proteine KIAA1549 und RIF1 noch relativ unbekannt sind, wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf die beiden Proteine PLZF und CRMP1 gelegt. CRMP1 ist verwandt mit den Proteinen Ulip (Maus), TOAD-64 (Ratte) und Unc-33 (*C. elegans*). Erste Hinweise, dass es einen Zusammenhang zwischen Sialinsäuren und Proteinen dieser Familie gibt, fanden Büttner et al. 2002, als sie PC12-Zellen (Pheochromocytomzellen der Ratte) mit einem unnatürlichen Vorläufer der Sialinsäuren, dem ManNProp inkubierten und zeigen konnten, dass dadurch das Neuritenwachstum induziert wurde. Die in diesen Zellen veränderte Proteinexpression wurde mittels 2D Gelelektrophorese und MALDI-TOF MS analysiert und dabei herausgefunden, dass unter anderem ein Protein herunterreguliert war, was von seiner Peptidmasse dem Ulip (Maus) entsprach (Buttner et al. 2002). Die Ergebnisse aus

dem Y2H und den MALDI-TOF MS Analysen sind erste Hinweise darauf, dass es eine Verbindung zwischen der GNE und dem CRMP1 gibt. Durch Co-Immunpräzipitation von GNE und CRMP1 aus PC12-Zellen konnte die Interaktion aus dem Y2H bestätigt werden. Die Interaktion mit dem PLZF hingegen konnte mittels Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden. Das kann an den Versuchsbedingungen liegen, die in diesem Falle nicht optimal für die Interaktion von PLZF und der GNE gewesen sein könnten. PLZF ist ein Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist, dagegen wurde die GNE als cytoplasmatisches Protein beschrieben. Eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen scheint also auf den ersten Blick eher unwahrscheinlich. Aber Studien zur Lokalisation der GNE belegen, dass die GNE mit Golgimarkern und Kernmarkern colokalisiert, was darauf hindeutet, dass die GNE sich auch im bzw. am Kern befinden kann (Krause et al. 2005). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass PLZF auch im Cytoplasma vorkommt, wo es mit Epsin 1 und dem C-Terminus des Angiotensin II (Ang II) Typ 2 Rezeptor (AT₂) assoziiert ist und nach Angiotensin II-Stimulierung in den Kern transportiert wird (Senbonmatsu et al. 2003, Hyman et al., 2000). Für die Co-Immunpräzipitation wurden sehr milde Bedingungen gewählt, da bei Anwesenheit von Detergenzien oder viel Salz die GNE ausfällt. Um trotz der milden Bedingungen auch die Kernproteine zu isolieren, wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Bei dieser Behandlung wird auch der Zellkern lysiert. In den so entstandenen Lysaten, die für die Co-Immunpräzipitation verwendet wurden, war das Kernprotein YY1 (Transcriptional repressor protein YY1) nachweisbar, trotzdem konnte das PLZF nicht in der Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. In den Lysaten war im Anti-PLZF-Westernblot lediglich eine spezifische Proteinbande bei ca. 50 kDa sichtbar. Das PLZF sollte im SDS-PAGE jedoch bei ca. 75-90 kDa laufen. Das berechnete Molekulargewicht des unprozessierten Proteins liegt bei 74,274 kDa. Auch die positive Kontrolle (Lysat von HL60-Zellen) zeigte diese 50 kDa-Proteinbande. Der Versuch mit unterschiedlichen Anti-PLZF-Antikörpern erbrachte ebenfalls nur diese 50 kDa-Proteinbande. Es gibt zwei Isoformen dieses Proteins, PLZFB mit ca. 75 kDa und eine kleinere Form PLZFA mit ca. 61 kDa. Es ist also wahrscheinlich auch nicht die PLZFA Isoform, da die Proteinbande dafür ein zu geringes Molekulargewicht aufweist. Möglicherweise ist diese Proteinbande ein Spaltprodukt des PLZF, das nicht in der Lage ist, mit der GNE zu interagieren. Deshalb wurde PLZF als ein GST-

Fusionsprotein zusammen mit einem GNE-His-Fusionsprotein in Insektenzellen überexprimiert und ein GST-pull down durchgeführt. Mit dieser Methode konnte im pull down-Assay die Interaktion von GNE mit dem PLZF nachgewiesen werden.

3.2.1 Der Interaktionspartner CRMP1

Das Collapsin Response Mediator Protein 1 ist ein cytoplasmatisches Phosphoprotein, welches ausschließlich im Nervensystem und dort hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert wird. Es ist unter anderem in neuronale Differenzierung und axonales Wachstum involviert. CRMP1 besteht aus 572 Aminosäuren und zeigt ein Molekulargewicht von ca. 62 kDa. Röntgenkristallstrukturanalysen von murinem CRMP1 enthüllten eine zweilappige lungenförmige Struktur des Proteins (Deo et al. 2004). CRMPs können miteinander Heterotetramere bilden, wobei bestimmte Konstellationen bevorzugt vorkommen (Wang und Strittmatter, 1997; Fukada et al. 2000). Die heterotetramere Struktur spiegelt die von vielen Metall-abhängigen Amidohydrolasen, wozu auch die bakterielle D-Hydantoinase zählt, wider. Bisher sind 5 verschiedene humane CRMPs (CRMP1-5) entdeckt worden, die zelltypspezifisch und entwicklungsabhängig exprimiert werden. Auch subzellulär zeigen sie eine spezifische Lokalisation. Von CRMP2 sind bisher sogar noch zwei Isoformen (CRMP2A und CRMP2B) bekannt, so dass eine große Vielfalt dieser Proteine existiert. Mit spezifischen Antikörpern konnte in Hirnschnitten von Mäusen nachgewiesen werden, dass CRMP1, CRMP2B und CRMP5 hauptsächlich in den Dendriten spezifischer neuronaler Populationen lokalisiert sind, nämlich in cortical-pyramidalen Neuronen, in hippocampalen CA1-pyramidalen Zellen oder Purkinje-Zellen. Im Gegensatz dazu war CRMP2A mit den Axonen des corpus callosum, mit den Bündeln des Striatum und den Moosfasern des Hippocampus assoziiert. CRMP2A und CRMP5 fehlten jedoch vollständig in Purkinje-Zellen in 12 Tage alten Tieren. Oligodendrocyten exprimieren ausschließlich CRMP2B und CRMP5 (Bretin et al. 2005). CRMP1 und CRMP5 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, interagieren aber nicht miteinander. Die CRMP-Komplexe können demnach in zwei Populationen geteilt werden, die entweder mit CRMP1 oder mit CRMP5 interagieren und eine große Kombinationsmöglichkeit aufweisen. Diese Komplexe besitzen dann

vermutlich unterschiedliche Funktionen in der Zelle. Goshima et al. isolierten 1995 erstmals ein 62 kDa-Protein, welches in den Collapsin-Signalweg involviert war. Dieses Collapsin Response Mediator Protein (CRMP-62) zeigte Homologien zu Unc-33 (*C. elegans*). Ein Anti-CRMP-62-Antikörper blockierte in DRG (Dorsal Root Ganglion) Neuronen den durch Collapsin induzierten Wachstumskegelkollaps (Goshima et al. 1995). Ein Jahr später wurden 3 cDNA-Klone aus humanem Gewebe isoliert, die 57-59 % Sequenzhomologie zu den Dihydropyrimidinasen (DHPasen) der Leber zeigten. Sie wurden deshalb Dihydropyrimidinase-related Proteins (DRP1-3) genannt (Hamajima et al. 1996). Das humane DRP-2 hat 98 % Sequenzhomologie zu dem CRMP-62 (Huhn) und wird in allen Geweben außer in der Leber exprimiert. DRP-3 zeigt zu zwei Teilsequenzen von TOAD-64 (Ratte) 94-100%ige Sequenzübereinstimmung und wird hauptsächlich in Herz und Skelettmuskel exprimiert, dagegen wird das DRP1 ausschließlich im Hirn exprimiert. Die humanen DRPs zeigen geringe Sequenzhomologie (32-34 %) zu Unc-33 (Nematode) und zu dem bakteriellen Enzym Hydantoinase (39-42 %). Im selben Jahr isolierten Wang und Strittmatter 4 Proteine mit hoher Sequenzhomologie zu CRMP-62 aus der Ratte und nannten sie rCRMP1-4 (Wang und Strittmatter, 1996). Dabei stellte sich heraus, dass rCRMP2 identisch ist mit TOAD-64 und am weitesten verbreitet im Nervensystem exprimiert wird, und rCRMP4 das Rattenhomolog zu Ulip der Maus darstellt. Alle vier Proteine werden ausschließlich im Nervensystem und hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert. CRMP1 und CRMP4 wurden nicht im adulten Nervensystem gefunden, wohingegen CRMP2 und CRMP3 auch im adulten Nervensystem nachweisbar waren. Dabei wurden sie im Hippocampus und Kleinhirn, das sind Gebiete mit hoher synaptischer Remodulierung und verbunden mit Lernen und Gedächtnis, nachgewiesen. Die humanen DRPs spielen nicht nur eine Rolle im ZNS sondern auch im ENS (Enteric nervous system), dem größten und komplexesten Teil des peripheren Nervensystems. Transkripte von DRP1-3 wurden im sich entwickelnden und adulten Verdauungstrakt der Mäuse und im adulten Dickdarm des Menschen nachgewiesen (Inagaki et al. 2000). Eine ganz neue Funktion für CRMP1 zeigten Honnorat et al. 1999, indem sie PND (Paraneoplastic Neurological Diseases)-Patienten untersuchten. Diese Krankheiten sind verbunden mit neuronaler Degeneration, die durch autoimmune Prozesse in Patienten mit systemischem Krebs hervorgerufen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten einen Anti-CV2-Antikörper besaßen, der spezifisch Ulip4/CRMP3 erkannte. Sie sequenzierten das

humane Ulip4/CRMP3 und konnten seine Lokalisation im Genom bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass das Gen in einer Region lokalisiert ist, die in Glioblastoma mutiert ist und Tumorsuppressorgene enthält (Honnorat et al. 1999). Dass CRMP1 ein Suppressor der Invasivität von Lungenkrebs ist, bewiesen Shih et al. (2001) indem sie verschiedene Lungenkrebszelllinien untersuchten. Die weniger invasiven Lungenkrebszelllinien exprimierten relativ große Mengen von CRMP1. Die Transfektion von CRMP1 in hochinvasive Zelllinien führte zur Reduzierung ihrer Invasivität um ca. die Hälfte (Shih et al. 2001, 2003). Des Weiteren konnte in einer begleitenden humanen Lungentumor-Gruppenstudie gezeigt werden, dass Patienten mit hoher CRMP1-Expression im Tumor länger krankheitsfrei waren und auch länger überlebten, als Patienten mit geringerer CRMP1-Expression. Wie schon erwähnt sind die CRMPs in den Prozess des Wachstumkegellapses involviert. Dabei wird filamentöses (F-) Aktin in den Filopodien der Zelle depolymerisiert. Und dort ist eventuell auch der Zusammenhang zur Suppressorfunktion der Invasivität des Lungenkrebses von CRMP1 zu sehen, denn für die Invasivität eines Tumors ist die Beweglichkeit der Krebszellen bedeutend. Mit CRMP1 transfizierte Lungenkrebszellen zeigten eine geringere F-Aktinfärbung in den Filopodien (Shih et al. 2001, 2003), was eventuell mit einer geringeren Beweglichkeit der Zellen verbunden ist. In Co-Immunpräzipitationen wurden CRMP1 und CRMP2 als Interaktionspartner der Rho Kinase α (ROK α) gefunden (Leung et al. 2002). CRMP1 und 2 könnten also Modulatoren des Rho-A abhängigen Signalweges sein und so den Abbau des F-Aktins regulieren. CRMP1 ist auch in den Wnt-Signalweg involviert, indem es mit Axin-1 interagiert (Stelzl et al. 2005). Im aktivierten Wnt-Signalweg wird die Phosphorylierung und der Abbau von β -Catenin verhindert und es kann in den Zellkern wandern, wo es Gene, die den Zellzyklus stimulieren, wie *Cyclin D1* und *Myc*, aktiviert. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiviert, so wird β -Catenin phosphoryliert und mit Hilfe eines Multiproteinkomplexes, der unter anderem die Proteine Axin-1, Cull1, E1 und E2 Ligasen beinhaltet, ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. β -Catenin ist einerseits über α -Catenin mit dem Cytoskelett verbunden andererseits bindet es an die cytoplasmatische Domäne von Cadherinen. Cadherine sind Kalzium-abhängige Rezeptoren, die über homophile Interaktionen die sogenannten Adherens junctions (AJs) bilden. Diese AJs sind verantwortlich für die interzelluläre Adhäsion und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der

Gewebearchitektur, Zellpolarität, bei der Begrenzung der Beweglichkeit von Zellen und Proliferation. Maligne Transformationen sind oft verbunden mit einer Änderung in der Organisation des Cytoskeletts, Abnahme der Adhäsion und veränderten Signalwegen. Die Abnahme der Adhäsion in Tumorzellen fördert die erhöhte Migration und Proliferation dieser Zellen, was wiederum zur Invasion und Bildung von Metastasen führt. Die bisher bekannten Daten über das CRMP1 Protein deuten alle darauf hin, dass es eine wesentliche Rolle bei der Organisation des Aktincytoskeletts spielt.

Die GNE-defizienten Mäuse überlebten nur bis Embryonaltag 8,5. Da Sialinsäuren vermutlich ohne Probleme vom Embryo über die Plazenta aufgenommen werden können, ist vermutlich nicht ein Sialinsäuremangel für das Absterben der Embryonen verantwortlich. Ab Tag 8,5 der Embryogenese sind die maternalen mRNAs nicht mehr ausreichend im Embryo vorhanden und die eigenen Transkripte müssen nun wirksam werden. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die Sialinsäuren sondern die GNE selbst eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spielt. Daher kann den Interaktionspartnern der GNE eine besondere Bedeutung zukommen. Da das CRMP1 in die Organisation des Aktincytoskeletts involviert ist, könnte eine Deregulation des Cytoskeletts zum frühen Tod der Embryonen beitragen. Die Migration ist während der Embryogenese und Entwicklung von besonderer Bedeutung, da gerade für diesen Zeitraum eine hohe Beweglichkeit der Zellen charakteristisch ist.

3.2.2 Der Interaktionspartner PLZF

Das Promyelozytische Leukämie Zinkfinger Protein besteht aus 673 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 74 kDa. Es besitzt N-terminal eine BTB/POZ (BR-C, ttk und bab/Pox Virus und Zinkfinger)-Domäne. C-terminal befinden sich 9 aufeinander folgende Zinkfinger-Motive des C2H2-Typs. Chen et al. identifizierten 1993 zum ersten mal das Gen des PLZF als einen Fusionspartner des Gens des Retinsäure-Rezeptors α (Retinoic acid receptor, RAR α) und fanden somit die Ursache für die Akute Promyelozytische Leukämie (APL) (Chen et al. 1993). Die Expression des PLZF ist am höchsten in undifferenzierten multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen und nimmt ab, je mehr die Zellen differenzieren (Reid et al. 1995).

PLZF wurde als ein negativer Regulator des Zellzyklus beschrieben, was sich in einer Wachstumsuppression äußert, in dem PLZF an den Cyclin A2-Promotor bindet und ihn unterdrückt. Die Deregulation der Cyclin A2-Expression durch das PLZF-RAR-Fusionsprotein spiegelt womöglich seinen oncogenen Mechanismus wieder (Yeyati et al. 1999). Mit einer *-/-* PLZF-Maus zeigten Barna et al., dass PLZF an der anterior-posterioren Musterbildung beteiligt ist und die Hox-Genexpression reguliert (Barna et al. 2000, 2002). Als Transkriptionsfaktor interagiert PLZF in einem Komplex zusammen mit anderen Proteinen mit Histon-Deacetylasen und verändert so die Struktur des Chromatins, was wiederum die Zugänglichkeit der Promotoren bestimmter Zielgene verändert und somit die Transkription beeinflusst. Außerdem spielt PLZF eine wichtige Rolle in adulten Keimzellen. Die Mäuse der Mutante „luxoid“ produzieren nur eine begrenzte Anzahl von normalen Spermatozoen und verlieren dann fortschreitend nach der Geburt ihre Keimzellen. Verantwortlich dafür ist eine Nonsense-Mutation in dem PLZF-Gen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PLZF und Oct4 in Spermato gonien coexprimiert werden (Buaas et al., 2004). Oct4 ist ein Transkriptionsfaktor, der kennzeichnend für die Pluripotenz von Stammzellen ist. PLZF spielt demnach nicht nur bei der Differenzierung sondern auch bei der Aufrechterhaltung der Stammzellen eine wichtige Rolle. Bisher sind 4 alternative Splicevarianten (AS-I, II, III und IV) des PLZF bekannt, wobei AS-I in allen getesteten Geweben exprimiert wurde, AS-II hauptsächlich im Magen, AS-III im Hoden und AS-IV im Herz (Zhang et al. 1999). Den Splicevarianten AS-II bis IV fehlen wichtige Domänen unter anderem die BTB-Domäne. Diese Domäne ist N-terminal bei 5-10 % aller C₂H₂-Zinkfinger-Proteine vorhanden. Sie ist eine hoch konservierte Protein-Protein Interaktionsdomäne und seit 1998 ist auch ihre Kristallstruktur bekannt (Ahmad et al. 1998). Die BTB-Domäne interagiert mit Komponenten des Histon-Deacetylase-Komplexes und besitzt transkriptionell-repressive Aktivität, indem die Konformation des Chromatins reguliert wird. Neueste Untersuchungen zeigten, dass viele BTB-Domänen, einschließlich die des PLZF, mit Cullin 3 interagieren (Xu et al. 2003, Furukawa et al. 2003, Geyer 2003 und Pintard et al. 2004). Cullin 3 gehört zu einem Proteinkomplex sogenannter E3-Ligasen, die Ubiquitin an Substratproteine binden. Es können sowohl Mono- als auch Polyubiquitine an ein Substratprotein gebunden werden. Die Ubiquitinierung von Proteinen stellt eine posttranslationale Modifikation dar, die vergleichbar mit anderen posttranslationalen Modifikationen wie die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei

der Regulation von Proteinen spielt. Mehr als 4 Ubiquitine an einem Protein sind ein Signal für den Abbau dieses polyubiquitinierten Proteins durch das Proteasom. Viele Membranproteine werden nach einem äußeren Signal monoubiquitinyliert und dann endocytiert, um über das Lysosom abgebaut zu werden. Histone sind ebenfalls monoubiquitinyliert und diese Monoubiquitinylierung hat einen Einfluß auf die Meiose der Zelle. Monoubiquitin ist auch ein Signal für die Translokation eines Proteins innerhalb der Zelle. Das Protein p53 wird nach Ubiquitinylierung aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert (Brooks et al., 2004). Die Monoubiquitinylierung der I κ B-Kinase reguliert ihre Phosphorylierung und Aktivierung (Carter et al., 2005). Neben dem Ubiquitin gibt es noch weitere kleine Proteine, z. B. SUMO, die posttranslational an Substratproteine geheftet werden und so ihre Funktion beeinflussen. Die Vermutung, dass die GNE mit dem PLZF interagiert, damit es dann ubiquitinyliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Auch eine SUMOylierung fand nicht statt. Diese Ergebnisse bedeuten jedoch nicht, dass eine Ubiquitinylierung/SUMOylierung der GNE nicht stattfindet. Man kann lediglich keine Aussage treffen und daher nur schlussfolgern, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Ubiquitin oder SUMO nachgewiesen werden konnte. Eventuell war das gewählte Zellsystem nicht optimal für die Untersuchungen. Es gibt Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen Ubiquitin und der GNE besteht. In der Doktorarbeit von Bettina Büttner wurde unter anderem auch die Herabregulation einer Ubiquitin C-terminalen Hydrolase Isoenzym L1 gefunden. Dieses Enzym bindet in Neuronen an Ubiquitin und stabilisiert Monoubiquitin (Osaka et al. 2003). Des Weiteren wurde in einem Y2H-Screening gegen eine cDNA Genbank aus Muskelgewebe mit der GNE als *bait* eine Ubiquitin-spezifische Peptidase gefunden (S. Rosenbaum, persönliche Mitteilung). Diese Befunde unterstützen die These, dass die GNE ubiquitinyliert wird. Da solche posttranslationalen Modifikationen auch etwas mit der Translokation in der Zelle zu tun haben, ist es nicht unwahrscheinlich, dass eine solche Modifikation der GNE zu einer Translokation aus dem Cytoplasma in/an den Kern führt. Krause et al. (2005) hatten bereits gezeigt, dass die GNE mit Kernmarkern colokalisiert. Da die GNE keine bekannte Kernlokalisationssequenz besitzt, ist die Modifikation mit einem solchen kleinen Protein ein möglicher Mechanismus für den Transport der GNE in oder an den Kern. Ein weiteres Enzym des Sialinsäure-Biosyntheseweges, die CMP-

NeuAc-Synthetase, ist über ihre Kernlokalisationssequenz im Zellkern lokalisiert und aktiviert dort die Sialinsäuren. Dieses Enzym wird vermutlich posttranslational durch SUMO modifiziert (R. Gerady-Schahn, persönliche Mitteilung).

3.3 Isolierung muriner ES Zellen

Im Rahmen ihrer Doktorarbeit generierte Matrina Schwarzkopf eine GNE-defiziente Maus (Schwarzkopf et al. 2002). Dieser homozygote KO war für die Mäuse embryonal lethal. Die Embryonen starben zwischen vor bzw. an Tag 8.5, dagegen überlebten die heterozygoten Mäuse mit einem funktionsfähigen Allel und zeigten keinerlei phänotypische Veränderungen. Da eine genauere Untersuchung der KO-Mäuse nicht möglich war, bieten embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eine gute Alternative, um das Fehlen der GNE bzw. das Fehlen von Sialinsäuren zu untersuchen. Für vergleichende Untersuchungen zwischen WT- und KO-ES-Zellen müssen beide Zelllinien aus ein und der selben Maus isoliert worden sein. Da keine WT- und KO-ES-Zellen aus der gleichen Maus zur Verfügung standen, wurden in dieser Arbeit neue ES-Zellen isoliert. Diese wurden anschließend auf ihre Stammzellmarker untersucht. Als Stammzellmarker wurden die Expression des Oberflächenantigens SSEA-1 (Stage Specific Embryonic Antigen-1), des Transkriptionsfaktors Oct-3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4) und die Aktivität der alkalische Phosphatase (AP) untersucht.

Die Aktivität der AP wurde mittels eines einfachen Farbttests gemessen. Sowohl die WT als auch die KO ES-Zellen zeigten deutliche Färbung im Vergleich zur Kontrolle. Es ist bekannt, dass in embryonalen Stammzellen die Aktivität der alkalischen Phosphatase sehr hoch ist. Beginnen die ES-Zellen zu differenzieren, nimmt die AP-Aktivität ab, deshalb nutzt man dieses Enzym als Marker für die Pluripotenz von ES-Zellen. Während der Entwicklung des Mausembryo in der Präimplantationsphase kann bereits im 2-, 4-, 8- und 16-Zellstadium AP-Aktivität nachgewiesen werden, wobei während der Differenzierung der Blastocyste in Trophoblast und innerer Zellmasse (Inner Cell Mass, ICM) die AP-Aktivität auf die ICM limitiert ist (Johnson et al. 1977, Mulnard und Huygens 1978, Izquierdo et al. 1980). In der Maus existieren 3 Isoformen der AP: embryonale AP (E-AP), gewebeunspezifische AP (Tissue non-

specific AP, TN-AP) und intestinale AP (I-AP). Beiden Isoformen E-AP und TN-AP werden in der Präimplantationsphase des Mausembryos exprimiert, wobei die E-AP das Haupttranskript darstellt und 10mal stärker exprimiert wird als die TN-AP (Hahnel et al. 1990). Während der frühen Postimplantationsphase findet eine Umkehr statt und die TN-AP ist das Haupttranskript in 7-14 Tage alten Embryonen. Auch in primordialen Keimzellen wird die TN-AP exprimiert (MacGregor et al. 1995). Die APs sind Phosphomonoesterasen und hydrolysieren Phosphomonoester zu anorganischem Phosphat und dem entsprechenden Alkohol. Sie sind meist an der Zelloberfläche lokalisiert, wo sie über GPI-Linker mit der Plasmamembran assoziiert sind. Die physiologische Funktion der APs ist jedoch noch unbekannt.

Des Weiteren wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-3/4 auf RNA-Ebene untersucht. Mittels RT-PCR konnte die Oct-3/4-Expression in WT- und KO-ES-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Transkriptionsfaktor wird spezifisch nur in totipotenten und pluripotenten ES-Zellen exprimiert und zwar in der Prägastrulationsphase des Embryos sowie in primordialen Keimzellen (Schöler et al. 1990, Okamoto et al. 1990, Rosner et al. 1990). Die Oct-3/4-Expression wird dann während der Differenzierung in Endoderm und Mesoderm herunterreguliert. Oct-3/4 ist Mitglied einer Proteinfamilie, die eine sogenannte POU-Domäne besitzen und an die Octamer-Bindestellen von Promotor- oder Enhancer-Regionen vieler ubiquitär exprimierter aber auch gewebespezifischer Gene binden. Interessanterweise werden alle Mitglieder dieser Proteinfamilie während der frühen embryonalen Entwicklung exprimiert (Ryan und Rosenfeld, 1997). Das Oct-3/4-Gen wurde bisher nur in Säugetieren gefunden.

Als dritter Pluripotenz-Marker wurde die Expression des SSEA-1 auf der Zelloberfläche mittels FACS analysiert. Auch bei diesem Experiment zeigten WT- und KO-ES-Zellen deutlich positive SSEA-1-Expression. Solter und Knowles generierten einen Antikörper, der mit embryonalen Karzinomzellen und mit Mausembryonen der Präimplantationsphase reagierte (Solter and Knowles 1978). Dieser Antikörper bindet an Kohlenhydrat-Epitope von Glykolipiden. Diese Strukturen werden LewisX (Le^x)-Antigene genannt und haben folgende Struktur: $Gal\beta 1 \rightarrow 4[Fuc \alpha 1 \rightarrow 3]GlcNAc-R$. Das Le^x -Antigen ist strukturell den Lewis-Blutgruppen-Antigenen sehr ähnlich. Das SSEA-1 ist ab dem 8-Zellstadium nachweisbar, jedoch nicht in differenzierten Zellen (Solter and Knowles 1978). Le^x -

Strukturen spielen bei der Kompaktion eine wichtige Rolle. Versuche mit Mausmorula und fukosylierten Oligosacchariden zeigten, dass Oligosaccharide, die Fukose $\alpha 1 \rightarrow 3$ oder $\alpha 1 \rightarrow 4$ gebunden hatten, die Kompaktion der Mausmorula inhibierten (Bird und Kimber 1984, Fenderson et al. 1986). Des Weiteren wird die Le^x-Struktur im embryonalen Hirn vieler Säugetiere exprimiert und spielt dort wahrscheinlich als Oberflächenkomponente eine wichtige Rolle während der Entwicklung des ZNS (Yamamoto et al. 1985). Auch durch Retinsäure-induzierte neuronale Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen (P19) führt zur Zunahme der Le^x-Expression (Osanai et al. 2001). Le^x-Strukturen *per se* können Le^x-Strukturen erkennen, basierend auf einer Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktion und zur Zellaggregation bzw. Adhäsion beitragen (Eggens et al. 1989, Kojima et al. 1994). Jedoch werden diese Le^x-Le^x-Interaktionen kontrovers diskutiert, da sie unterhalb der thermischen Energie stattfinden (Pincet et al. 2001). Des Weiteren zeigen neueste Untersuchungen, dass Fukosyltransferase IX-defiziente Mäuse kein SSEA-1 exprimieren, und sich trotzdem völlig normal entwickeln und fertil sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass SSEA-1 nicht essentiell für die Embryogenese ist (Kudo et al. 2004). Einen kurzen Überblick über das SSEA-1-Antigen und über Kohlenhydratstrukturen auf embryonalen Zellen geben die Reviews von Fenderson et al. 1990 und Fenderson und Andrews 1992.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es möglich war WT- und KO-ES-Zellen aus ein und der selben Maus zu isolieren und diese Zellen zu kultivieren, wobei alle drei untersuchten Stammzellmarker (AP, Oct-3/4, SSEA-1) exprimiert wurden und somit die Pluripotenz dieser Zellen gegeben war.

3.4 Charakterisierung muriner GNE-defizienter ES-Zellen

Für die Untersuchungen wurden die Zellen in zwei verschiedenen Medien kultiviert. In serumhaltigen Medium (FCS) und in einem Serumersatzmedium (SR), das deutlich weniger Sialinsäuren enthielt. Die Epimerase-Aktivität der WT-ES-Zellen war unterschiedlich, wobei die Erhöhung der Enzymaktivität der WT-ES-Zellen, die im SR-Medium kultiviert wurden, mit dem gesteigerten Bedarf an Sialinsäuren zu erklären ist. Zellen sind in der Lage, aus dem Medium freie und gebundene

Sialinsäuren aufzunehmen und in Glykokonjugate einzubauen (Oetke et al. 2001). Ein Teil der in den Zellen benötigten Sialinsäuren wird recycelt, in dem sie von den Glykokonjugaten abgespalten und wieder verwendet werden (Mendla et al. 1988, Ferwerda et al. 1981, Chigorno et al. 1996). In dem SR-Medium sind diese sialylierten Glykokonjugate nur in sehr geringer Konzentration vorhanden gewesen, so dass durch eine gesteigerte Epimerase-Aktivität der Bedarf an Sialinsäuren gedeckt werden musste. Die erhöhte Epimerase-Aktivität führte jedoch nicht zu einer höheren Sialinsäurekonzentration, wie Messungen der Gesamtsialinsäurekonzentration ergaben. Es wurde eine vergleichbare Sialinsäurekonzentration der WT-ES-Zellen in serumhaltigem Medium erreicht. Eine „Überproduktion“ kann in der WT-ES-Zelle nicht geschehen, da die Epimerase-Aktivität durch das Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, der CMP-NeuAc, inhibiert wird. Die KO-ES-Zellen besaßen erwartungsgemäß keine Epimerase-Aktivität. Im Vergleich zu den WT-ES-Zellen zeigten sie eine um 30 % (FCS-Medium) bzw. 50% (SR-Medium) geringere Sialinsäurekonzentration. Die Zellen enthielten immer Sialinsäuren, da sie diese aus dem Medium aufnahmen. Man kann zwar die Sialinsäuren reduzieren, jedoch nicht völlig eliminieren. Außerdem würden völlig sialinsäurefreie Zellen nicht überleben. Die Gesamtsialylierung konnte durch Inkubation mit dem Vorläufer ManNAc wieder gesteigert werden. Die Erhöhung der Sialylierung nach ManNAc-Applikation reflektiert eine Umgehung der Feedback-Inhibition der UDP-GlcNAc 2-Epimerase indem dieser Aminozucker downstream der sehr genau regulierten UDP-GlcNAc 2-Epimerase in den Biosyntheseweg eintritt. In der Arbeit von Matrina Schwarzkopf wurden die KO-ES-Zellen mit 10 mM ManNAc inkubiert und dabei konnte sogar eine 70 %ige Steigerung in der Oberflächensialylierung (LFA) detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zweitägige Inkubation mit 1-3 mM ManNAc ausreicht, um eine den WT-ES-Zellen vergleichbare Sialinsäurekonzentration in Gesamtzelllysaten zu erreichen. Da bei den KO-ES-Zellen keine Feedback-Inhibition möglich ist, wurde mit höherer ManNAc-Konzentration auch eine höhere Gesamtsialylierung erreicht, diese lag bei mehr als 200 %.

Da bei Proteinen nur begrenzt freie Galaktosen als Akzeptor für neue Sialinsäuren zur Verfügung stehen, kann man nicht von der Gesamtsialinsäurekonzentration auf die Sialylierung der Zelloberfläche schließen. Um zu beurteilen, ob die Kultivierung mit ManNAc auch zu einer Erhöhung der Oberflächensialylierung führte, wurden die

Zellen mittels eines Sialinsäure-spezifischen Antikörpers bzw. eines Lektins im FACS untersucht. Die Analyse mit dem Lektin LFA zeigte etwa gleiche Oberflächensialylierung bei den WT-ES-Zellen unabhängig davon, ob sie im serumhaltigen Medium oder im Serumersatzmedium kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu wiesen die KO-ES-Zellen Unterschiede auf. Im Serumersatzmedium fehlten den KO-ES-Zellen offenbar genügend Sialinsäuren, um diese auch an der Zelloberfläche zu exprimieren. Selbst in serumhaltigen Medium zeigten sie im Vergleich zum WT eine geringere Oberflächensialylierung, jedoch eine höhere Sialylierung als zu den KO-ES-Zellen ohne Serum. Nach ManNAc-Inkubation stieg die Oberflächensialylierung an. Auch Untersuchungen mit einem Anti-SiaLe^x-Antikörper zeigten eine Zunahme der Oberflächensialylierung nach ManNAc-Supplementierung. Die ES-Zellen exprimieren jedoch nur sehr wenig SiaLe^x auf ihrer Zelloberfläche. Wurden die KO-ES-Zellen in Serumersatzmedium kultiviert, war gar kein SiaLe^x auf ihrer Zelloberfläche nachweisbar. Auch nach Inkubation mit 1 mM ManNAc war noch kein Anstieg messbar. Erst mit 3 mM und 10 mM ManNAc konnte SiaLe^x auf der Zelloberfläche der KO-ES-Zellen nachgewiesen werden. Embryonale Zellen exprimieren ungewöhnlich große Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Zelloberfläche. Diese Strukturen werden auch als Embryoglykane bezeichnet und gehen während der Differenzierung verloren. Embryoglykane setzen sich zusammen aus alternierenden Galaktose- und *N*-Acetylglukosaminresten und haben eine lineare oder verzweigte Architektur. Im Vergleich zu differenzierten Zellen sind die Embryoglykane äußerst gering sialyliert (Ivatt 1987). Einige Untersuchungen an Mausembryonen jedoch belegen, dass einige Kohlenhydratstrukturen während der frühen Embryogenese von Sialinsäuren maskiert sind (Fenderson et al. 1983, Marticorena et al. 1983). Außerdem ist Sialoadhesin eines der häufigsten Proteine, die von Stammzellen exprimiert werden (Anisimov et al., 2002).

Wie schon erwähnt sterben die GNE-defizienten Mäuse vor oder am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung. Nachdem sich die Blastocyste in der Gebärmutter eingenistet hat, proliferieren die Zellen der Blastocyste stark. Genau in dieser Phase (5.-10. Tag) starben die KO-Mäuse ab, deshalb wurden die ES-Zellen, bezüglich ihrer Fähigkeit zu proliferieren, untersucht. In einem BrdU-Assay konnten keine Unterschiede in der Proliferation zwischen WT- und KO-ES-Zellen gemessen werden. Auch bei diesem Experiment wurden die Zellen in serumhaltigem Medium (FCS) und Serumersatzmedium (SR) kultiviert. Die Proliferation war jedoch, völlig unabhängig

davon, ob das Kulturmedium FCS oder SR enthielt, zwischen WT- und KO-ES-Zellen immer gleich. Eine leichte Abnahme der Proliferation nach ManNAc-Inkubation konnte sowohl bei den WT- als auch bei den KO-ES-Zellen (ebenfalls unabhängig von FCS und SR im Medium) gemessen werden. Diese Abnahme ist jedoch nicht auf eine höhere Sialylierung der Zellen zurückzuführen, da die Kontrollkulturen mit GlcNAc ebenfalls eine Abnahme der Proliferation zeigten. Vielmehr ist diese Abnahme wohl auf die veränderte Osmolarität des Mediums zurückzuführen. In einem erst kürzlich erschienenen Artikel von Wang et al. (2006) wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK) mit rekombinanter GNE transfiziert. Diese Zellen zeigten dann eine Reduzierung in Proliferation und erhöhte Apoptose. Durch die Überexpression der GNE wurde auch die Transkription der Sialyltransferasen ST3Gal5 (GM3-Synthase) und ST8Sia1 (GD3-Synthase) verändert und führte zu einer erhöhten Synthese der Ganglioside GM3 bzw. GD3. Der gegenteilige Effekt konnte beobachtet werden bei HEK Zellen mittels RNAi reduzierter GNE-Expression. Die Reduzierung der GNE-Expression führte zur erhöhten Proliferation der Zellen. Ausgehend von diesen Experimenten würde man annehmen, dass die Proliferation in den KO-ES-Zellen erhöht sein müsste. Es konnte jedoch keine erhöhte Proliferation im Vergleich zu den WT-ES-Zellen beobachtet werden. Diese kontroversen Beobachtungen können in den verschiedenen Zellsystemen (humane embryonale Nierenzellen versus murine embryonale Stammzellen) begründet sein. Ganglioside sind sialinsäurehaltige Glykosphingolipide und diese spielen bei der Entwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle. Mausembryonen, die einen Defekt der Glykosphingolipid-Synthese besitzen, können keine Glykosphingolipide und somit auch keine Ganglioside exprimieren. Diese Glukosylceramid-Synthase defizienten Mäuse sind embryonal lethal, was auf die enorme Bedeutung der Glukosylceramid-Synthase hindeutet (Yamashita et al. 1999). Die Glukosylceramid-Synthase defizienten Embryonen zeigen eine normale Entwicklung in der Präimplantationsphase und zu Beginn der Gastrulation (Differenzierung in Mesoderm, Endoderm und Ektoderm), doch während der Gastrulation sterben die Embryonen abrupt ab. Der Grund für das plötzliche Absterben der Embryonen lag hauptsächlich in der massiven Apoptose von Zellen, die vorwiegend das Ektoderm betraf. Dieser ektodermale Defekt könnte zur Apoptose der Embryonen geführt haben und verdeutlicht die Bedeutung ektodermaler Zellen als Vorläufer des ZNS, wo die Ganglioside hauptsächlich exprimiert werden. Da in der

Arbeit von Martina Schwarzkopf nicht eindeutig geklärt werden konnte, zu welchem Zeitpunkt die GNE-defizienten Embryonen abstarben, ist es durchaus denkbar, dass hier ebenfalls ein ektodermaler Defekt zum Absterben der Embryonen geführt haben könnte. Das Gangliosid GM3 könnte dabei eine Schlüsselrolle spielen, da Untersuchungen an frühen Mausembryonen gezeigt haben, dass durch Apoptose-induzierende Substanzen die GM3-Synthese veränderte und zum Anstieg der GM3-Transkription in den apoptotischen Zellen führte (Ju et al. 2005). Viele Studien lassen vermuten, dass das Gangliosid GD3 eine entscheidene Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielt (Seyfried 1987, Bouvier und Seyfried 1989). Aber Untersuchungen an ES-Zellen, die GD3-Synthase defizient waren und keine Ganglioside der b-Serie synthetisierten, konnten induziert werden und neuronale Differenzierung durchführen, so dass die GD3-Synthase bzw. Ganglioside der b-Serie nicht essentiell sind für die neuronale Entwicklung (Kawai et al. 1998).

Die frühe embryonale Lethalität GNE-defizienter Mäuse und die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner der GNE legen die Vermutung nahe, dass dieses Enzym außer der Biosynthese von Sialinsäuren auch noch andere Funktionen ausüben könnte. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass viele Proteine mehrere unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben können, wie z. B. der 19S-Basis-Komplex des Proteasoms, der zusätzlich in die RNA PolIII-Transkription involviert ist (Gonzalez et al. 2002). Ob die GNE wirklich andere Funktionen in der Zelle ausübt, werden zukünftige Experimente zeigen.