

## III Ergebnisse

### 3.1. Expression und biochemische Charakterisierung neuer GNE-Isoformen

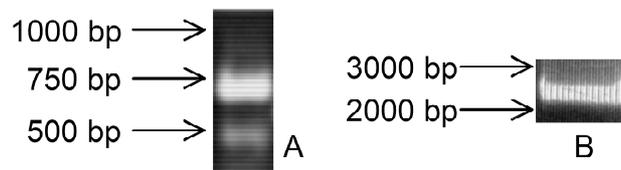
#### 3.1.1. Identifizierung der Primärstrukturen der humanen GNE-Isoformen

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) setzt UDP-GlcNAc in ManNAc um und phosphoryliert es dann anschließend in 6-Position. Die Epimerisierung ist irreversibel und geschwindigkeitsbestimmend und damit der Schlüsselschritt der Sialinsäurebiosynthese. Watts *et al.* (2003) konnten bei Mutationsanalysen des Genoms von h-IBM-Patienten zeigen, daß die GNE in mehreren Spleißvarianten existiert. Dies läßt den Schluß zu, daß die GNE auch in mehreren Protein-Isoformen vorliegt, für die hier zunächst eine neue Nomenklatur eingeführt wird. Da das Exon 1 des GNE-Gens ein nichtcodierendes Exon ist (Abb. 9), ergibt sich für die Spleißvarianten I und IV ein Protein von 722 Aminosäuren. Dieses Protein, GNE1, entspricht dem ursprünglich beschriebenen GNE-Protein (Lucka *et al.*, 1999). Die Spleißvariante II codiert das Protein GNE2, welches am N-Terminus um 31 Aminosäuren verlängert ist. Bei GNE3, dem von der Spleißvariante III codierten Protein, werden im Vergleich zu dem ursprünglichen GNE-Protein die ersten 59 Aminosäuren gegen 14 andere Aminosäuren ausgetauscht.

Zunächst wurden in verschiedenen genomischen und cDNA-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) GNE2- und GNE3-codierenden Sequenzen gefunden, die die oben beschriebenen Primärstrukturen bestätigen konnten (Reinke, 2004). Allerdings wiesen diese Einträge in den Exon-Intron-Übergängen Diskrepanzen zu den von Watts *et al.* (2003) publizierten Sequenzen auf. Zur Aufklärung dieser Unterschiede wurden die Isoform-codierenden cDNAs über eine RT-PCR amplifiziert. Humane QUICK-Clone<sup>TM</sup> Plazenta-cDNA wurde als Template verwendet. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt. Im Ersten wurden die Primer hGNE2-For und hGNEA-Rev, im zweiten Ansatz die Primer hGNE2-For und hGNEB-Rev verwendet. Der Primer hGNE2-For bindet im nichtcodierenden Bereich von Exon A1, der Primer hGNEA-Rev im Exon 3 und der Primer hGNEB-Rev im Exon 12 und enthält dabei das Stopcodon. Die sichtbaren PCR-Produkte von 700 bp und 500 bp (Abb. 17A) bzw. von 2500 bp (Abb.

## Ergebnisse

17B) wurden in den pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor kloniert und sequenziert. In beiden Fällen bestätigten die Sequenzanalysen die Vorhersage der Aminosäuresequenzen der Isoformen GNE2 und GNE3 aus den cDNAs der Datenbankeinträge. Die Sequenzen der 5'-Enden der cDNAs und die N-Termini von human GNE1, GNE2 und GNE3 sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abbildung 17: Amplifikation von GNE2- und GNE3-codierender cDNA aus humaner Plazenta.** (A) PCR-Ansatz mit den Primern hGNE2A-For/hGNEA-Rev. (B) PCR-Ansatz mit den Primern hGNE2A-For/hGNEB-Rev.

### 3.1.2. Analyse von GNE-Isoformen aus nicht-humanen Spezies

Die Homologie der Aminosäuresequenz von GNE1 ist sehr hoch, zwischen Ratte und Maus sind 4, zwischen Ratte und Mensch 10 und zwischen Maus und Mensch 12 von 722 Aminosäuren unterschiedlich (Tabelle 1). Die weitere Suche in cDNA-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) zeigte ein analoges Exon A1, daß für das Maus-Homolog von GNE2 codiert. Die Sequenzhomologie auf cDNA-Ebene von murinem und humanem Exon A1 beträgt 75%, wohingegen die entsprechenden Proteinsequenzen von GNE2 nur eine Homologie von 58% zwischen den einzelnen N-Termini aufweisen (Abb. 19).

Erweiterte Datenbanksuchen ergaben das Vorkommen von GNE2- und GNE3-codierenden Sequenzen auch in anderen Spezies (Tabelle 1). Zunächst konnte sowohl für alle untersuchten Säugetiere, als auch für Huhn, Zebra- und Kugelfisch das Protein homolog zum humanen GNE1 gefunden werden. Innerhalb der Säugetiere liegt die Sequenzähnlichkeit höher als 95%. GNE1 vom Huhn zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 93%, wobei GNE1 der verschiedenen Fischarten nur eine Ähnlichkeit von etwa 80% zu hGNE1 zeigt. GNE2-codierende cDNA wurde bei allen untersuchten Affenspezies, der Maus, der Ratte und dem Huhn gefunden. Die Sequenzhomologien liegen in demselben Bereich wie GNE1. Vergleicht man nur den zusätzlichen N-Terminus von GNE2 der Maus, der Ratte und dem Huhn, mit human GNE2, so fällt die Sequenzhomologie auf unter 60%. Aus den Affengenomen konnte zusätzlich die cDNA für GNE3 vorhergesagt werden. Bei der Maus, der Ratte und

dem Huhn konnte ein für GNE3 spezifisches Exon A1, analog zum humanen GNE3 spezifischen Exon A1, gefunden werden, welches aber nicht das GNE3-spezifische Startcodon enthielt. Damit konnte keine GNE3-mRNA postuliert werden. Das Vorkommen der einzelnen Isoformen innerhalb der verschiedenen Spezies ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

## GNE1

1 **M E K N G N N R K L R V C V A T**  
 1 ATG GAG AAG AAT GGA AAT AAC CGA AAG CTG CGG GTT TGT GTT GCT ACT

17 **C N R A D Y S K L A P I M F G I**  
 49 TGT AAC CGT GCA GAT TAT TCT AAA CTT GCC CCG ATC ATG TTT GGC ATT

33 **K T E P E F F E L D V V V L G S**  
 97 AAA ACC GAA CCT GAG TTC TTT GAA CTT GAT GTT GTG GTA CTT GGC TCT

49 **H L I D D Y G N T Y R M I ... Y 722**  
 145 CAC CTG ATA GAT GAC TAT GGA AAT ACA TAT CGA ATG ATT ... TAC 2166

## GNE2

-31 **M E T Y G Y L Q R E S C F Q G P**  
 -93 **ATG GAA ACC TAT GGT TAT CTG CAG AGG GAG TCA TGC TTT CAA GGA CCT**

-15 **H E L Y F K N L S K R N K Q I M**  
 -45 **CAT GAA CTC TAT TTT AAG AAC CTC TCA AAA CGA AAC AAG CAA ATC ATG**

2 **E K N G N N R K L R V C V A T C**  
 4 GAG AAG AAT GGA AAT AAC CGA AAG CTG CGG GTT TGT GTT GCT ACT TGT

18 **N R A D Y S K L A P I M F G I K**  
 52 AAC CGT GCA GAT TAT TCT AAA CTT GCC CCG ATC ATG TTT GGC ATT AAA

34 **T E P E F F E L D V V V L G S H**  
 100 ACC GAA CCT GAG TTC TTT GAA CTT GAT GTT GTG GTA CTT GGC TCT CAC

50 **L I D D Y G N T Y R M I ... Y 722**  
 148 CTG ATA GAT GAC TAT GGA AAT ACA TAT CGA ATG ATT ... TAC 2166

## GNE3

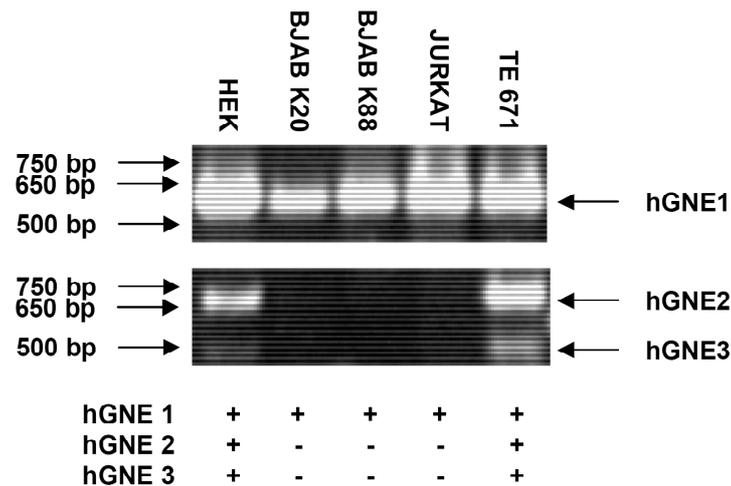
I M V I C R G S H A F K D L I XIV  
 -83 **ATG GTT ATC TGC AGA GGG AGT CAT GCT TTC AAG GAC CTC ATA** 165

56 **N T Y R M I ... Y 722**  
 166 AAT ACA TAT CGA ATG ATT ... TAC 2166

**Abbildung 18: N-terminale Sequenzen der hGNE-Isoformen.** Die obere Zeile zeigt die Aminosäuresequenzen, die untere Zeile zeigt die cDNA-Sequenzen. Die fett gedruckten Aminosäuren sind für GNE1 und GNE2 gleich. GNE2-spezifische Aminosäuren sind einfach gedruckt und mit negativen Zahlen nummeriert. GNE3-spezifische Aminosäuren sind einfach gedruckt und mit römischen Zahlen nummeriert. Fett gedruckte Nucleotide werden von Exon A1 codiert, einfach gedruckte Nucleotide werden von Exon 2 codiert und unterstrichene Nucleotide werden von Exon 3 codiert. Kursive Zahlen geben die letzte Aminosäure bzw. das letzte Basentriplett an.



Primer in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Template für die RT-PCR diente. Als Primer wurden zum einen hGNE1-For und hGNEA-Rev und zum anderen hGNE2-For und hGNEA-Rev eingesetzt. In allen Zelllinien ist GNE1-codierende mRNA vorhanden, wohingegen GNE2- und GNE3-codierende mRNA jeweils nur in HEK (Human Embryonic Kidney)- und TE671 (Rhabdomyosarkom)-Zellen vorhanden sind (Abb. 20).



**Abbildung 20: Verteilung der GNE-Isoformen innerhalb verschiedener humaner Zelllinien.**

In einem zweiten Ansatz wurde ein cDNA-Panel von zehn verschiedenen humanen Geweben als Template für die RT-PCR eingesetzt. Es wurden dieselben Primer verwendet. In jedem untersuchten Gewebe kommt hGNE1-codierende mRNA vor (Abb. 21). Dies wurde auch in früheren Arbeiten mit Northern-Blot-Analysen gezeigt (Lucka *et al.*, 1999). Mittels einer radioaktiven Sonde konnte dort hGNE1 in Herz, Gehirn, Niere, Leber, Plazenta, Lunge, Pankreas und Skelettmuskel nachgewiesen werden.

In Niere, Leber, Plazenta und Dickdarm kommt hGNE2-codierende mRNA vor (Abb. 21). Da das Experiment mit den verschiedenen humanen Zelllinien suggeriert, daß in der Niere hGNE3 exprimiert wird (Abb. 20), wurde die RT-PCR mit einer höheren Zyklenzahl wiederholt. Auch in Gehirn, Lunge und Pankreas kommt hGNE2-codierende mRNA vor. In Niere, Leber, Plazenta und Dickdarm kommt hGNE3-codierende mRNA vor, jedoch in einer wesentlich geringeren Expressionsrate. Ein Ergebnis der RT-PCR ist das Fehlen von hGNE2- und hGNE3-codierende mRNA im Skelettmuskel, was dem vorherigem Experiment mit den verschiedenen humanen

## Ergebnisse

Zelllinien widerspricht. In TE671-Zellen, einer Skelettmuskel-Zelllinie, ist hGNE2- und hGNE3-codierende mRNA vorhanden.

Mit Northern-Blot-Analysen konnten die Ergebnisse nicht verifiziert werden. Zum einen wurde in früheren Experimenten (Lucka *et al.*, 1999) keine zusätzliche Bande beobachtet. Zum anderen zeigten im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Northern-Blots mit hGNE2-spezifischen, radioaktiven Sonden ebenfalls keine Banden.

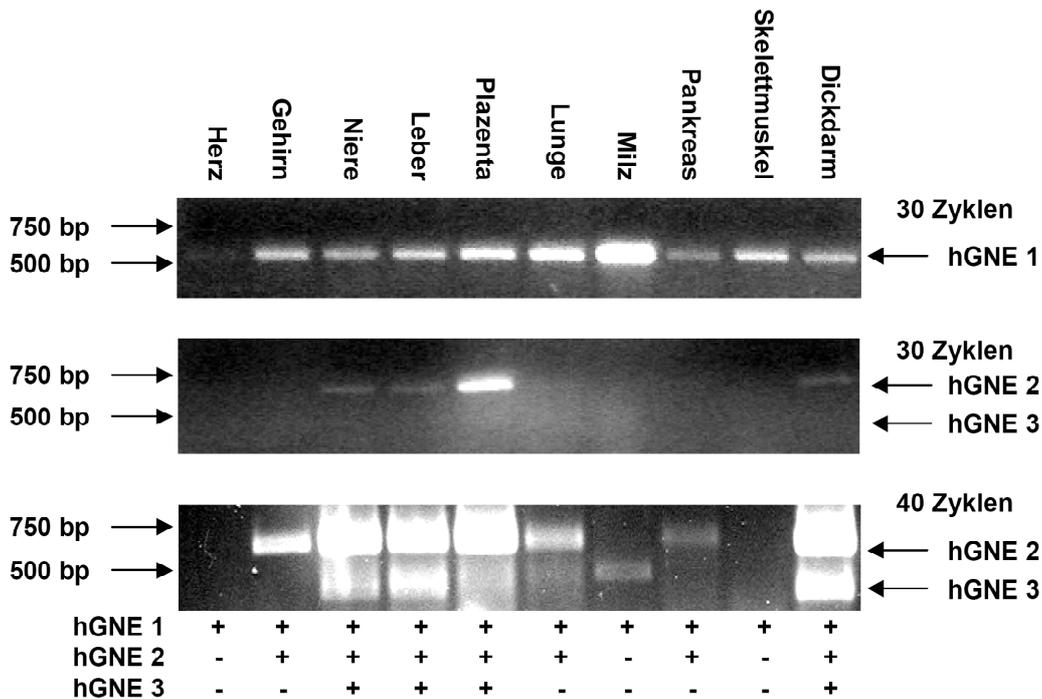


Abbildung 21: Gewebsspezifische Verteilung der humanen GNE-Isoformen codierenden mRNAs.

Ein Panel mit fünf verschiedenen murinen Geweben wurde als Template für eine RT-PCR zur Detektion von murinen GNE1- und GNE2-codierenden mRNAs eingesetzt. Als Primer wurden die Forward-Primer mGNE1-For und mGNE2-For und als Reverse-Primer mGNE-Rev verwendet. Analog zu human GNE1 konnte in allen untersuchten Geweben mGNE1-codierende mRNA nachgewiesen werden (Abb. 22), was wiederum mit früheren Ergebnissen aus Northern-Blot-Analysen übereinstimmt (Horstkorte *et al.*, 1999). Murine GNE2-codierende cDNA kommt, mit Ausnahme der Leber, in allen untersuchten Geweben vor. Während hGNE2 in der Leber und nicht im Skelettmuskel vorkommt, liegt bei mGNE2 der umgekehrte Fall vor. Zur Kontrolle wurde das aus dem Gehirn amplifizierte PCR-Fragment ausgeschnitten, extrahiert und in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor ligiert. Die nach einer Transformation von *E.coli* TOP10 Zellen isolierten Plasmide wurden sequenziert und mit den

Datenbankeinträgen verglichen. Bis auf eine stille Mutation (CTC⇒CTT) stimmen die GNE2-codierenden cDNA-Sequenzen vollkommen überein. Die PCR-Analyse der Gehirnprobe weist eine Doppelbande auf (Abb. 22). Dieses PCR-Fragment wurde ebenfalls ausgeschnitten, in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor ligiert und sequenziert. Das kleinere PCR-Produkt wurde als Syntaxin-Binding-Protein 1 identifiziert.

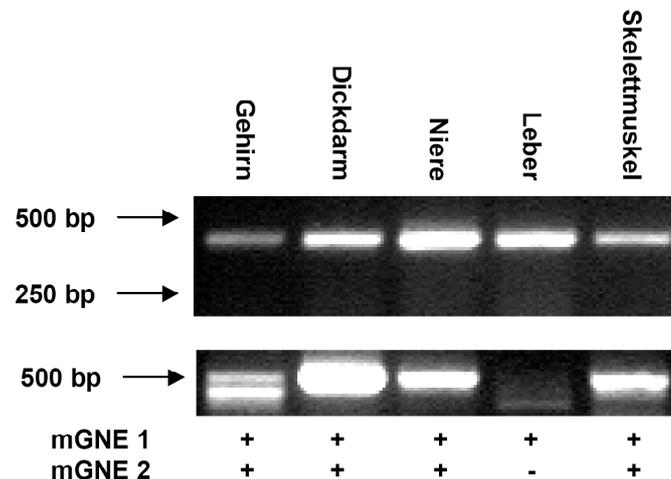


Abbildung 22: Gewebsspezifische Verteilung der murinen GNE-Isoformen codierenden mRNAs.

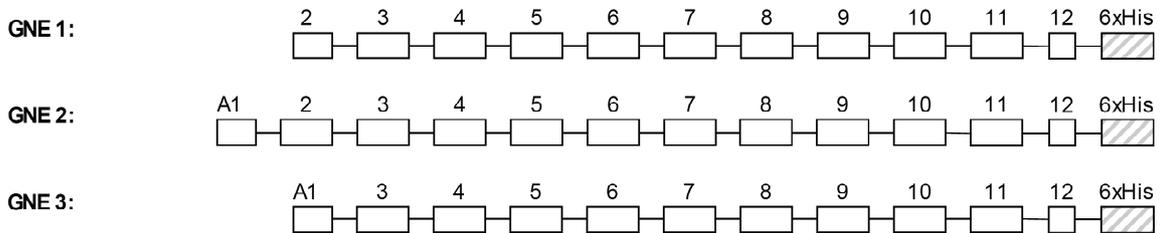
### 3.1.4. Expression der GNE-Isoformen in Insektenzellen mit dem BAC-TO-BAC<sup>®</sup>-Baculovirussystem

#### 3.1.4.1. Klonierung der humanen und murinen GNE-Isoform-codierenden cDNAs

Die nächste Aufgabe bestand darin, die cDNAs (Abb. 23) der humanen und murinen GNE-Isoformen in den Expressionsvektor für Insektenzellen zu klonieren, um anschließend die Proteine exprimieren und charakterisieren zu können. Die GNE-Isoformen unterscheiden sich alle im N-Terminus. Da die Funktion der verschiedenen N-Termini genauer untersucht werden sollte, wurden alle Konstrukte für spätere Arbeiten und Analysen mit einem C-terminalen 6xHis Tag versehen. Als Template der PCR für die Amplifikation der humanen GNE1 und GNE3 wurde die cDNA pFASTBAC<sup>™</sup> HTa-His-hGNE1, die schon in früheren Arbeiten verwendet wurde (Hinderlich *et al.*, 1997), eingesetzt. Kommerziell erhältliche humane QUICK-Clone<sup>™</sup> Plazenta-cDNA wurde als Template der PCR für die Amplifikation von human GNE2 eingesetzt. Für die Amplifikation von hGNE1 und hGNE2 wurden die Forward-Primer hGNE1-For bzw. hGNE2-For verwendet. Für die Amplifikation von

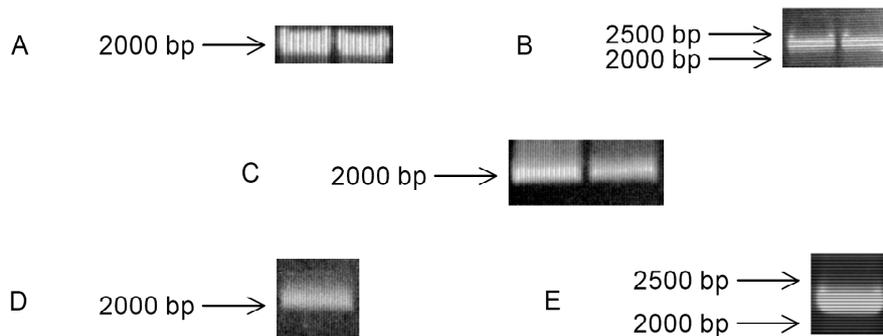
## Ergebnisse

hGNE3 wurde der degenerierte Forward-Primer hGNE3-For, der die Codons der GNE3-spezifischen Aminosäuren enthält, eingesetzt. Für alle PCR-Reaktionen wurde der folgende degenerierte Reverse-Primer, hGNE-Rev, der den zusätzlichen 6xHis-Tag und das Stopcodon codiert, verwendet.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der cDNAs der klonierten Konstrukte.** Die Boxen stellen die codierenden Exons (analog zu Abb. 13) dar. Die Konstrukte wurden zusätzlich mit einem C-terminalen 6xHis-Tag versehen.

Für die Amplifikation von murin GNE1 und GNE2 wurde der Klon IRAKp961E1325Q2 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung; Berlin, Deutschland) als Template der Klonierungs-PCR eingesetzt. Die Forward-Primer mGNE1-For bzw. mGNE2-For und der degenerierte Reverse-Primer mGNE-Rev, der den zusätzlichen 6xHis-Tag und das Stopcodon codiert, wurden für die Amplifikation verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte (Abb. 24) wurden ausgeschnitten, extrahiert und in den pCR®-Blunt-Vektor ligiert.



**Abbildung 24: PCR-Produkte der humanen und murinen GNE-Isoform-codierenden cDNAs.** (A) hGNE1, (B) hGNE2, (C) hGNE3, (D) mGNE1, (E) mGNE2.

Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um positive Klone, die die cDNAs in geeigneter Orientierung für die anschließende Umklonierung in den pFASTBAC™ 1-Vektor enthielten, zu identifizieren. Die Plasmide der positiven Klone wurden isoliert und mit den Primern

M13-For (5' IRD 800) und M13-Rev (5' IRD 700) ansequenziert. Nach Bestätigung der DNA-Sequenzen wurden die klonierten Fragmente mit XhoI und KpnI ausgeschnitten und in den pFASTBAC<sup>TM</sup> 1-Vektor ligiert. Es wurden wiederum *E.coli* TOP10-Zellen transformiert, Plasmide isoliert und sequenziert. Für die Sequenzierung der cDNAs der humanen und der murinen Isoformen wurden 5'-fluoreszenz-gelabelte Primer verwendet. Mit diesen Primern konnten die klonierten Fragmente upstream und downstream jeweils komplett sequenziert werden. Die Sequenzen der cDNA-Konstrukte von hGNE2, mGNE1 und mGNE2 waren fehlerfrei. Bei der cDNA von hGNE1 fehlte im Startcodon ATg die Base A, bei der cDNA von hGNE3 war statt dem Startcodon ATg ein TCg vorhanden. Daraufhin wurde mit der cDNA von hGNE1 und hGNE3 eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Verwendet wurden die Primer MuthGNE1-For und MuthGNE1-Rev für hGNE1 und MuthGNE3-For und MuthGNE3-Rev für hGNE3. Nach erfolgreicher Mutagenese-PCR, anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen und Plasmid-DNA-Isolation wurden die beiden Konstrukte nochmals durchsequenziert. Die Sequenz der cDNA für hGNE1 war nun in Ordnung. Bei der cDNA für hGNE3 wurde die ursprüngliche Mutation korrigiert, allerdings hatte eine Mutation an anderer Stelle stattgefunden. In Position 1195 der cDNA für hGNE3 fand ein Austausch von A nach g statt. Das hatte ein Aminosäureaustausch von Lysin (K) in Glutamat (E) an der Position 399 zur Folge. Aus diesem Grund wurde eine zweite Mutagenese-PCR mit den Primern MuthGNE3II-For und MuthGNE3II-Rev durchgeführt. Das erhaltene hGNE3-cDNA-Konstrukt wurde durchsequenziert. Nun war auch diese cDNA-Sequenz fehlerfrei.

### 3.1.4.2. Generierung des Baculovirus und Pilotexpression

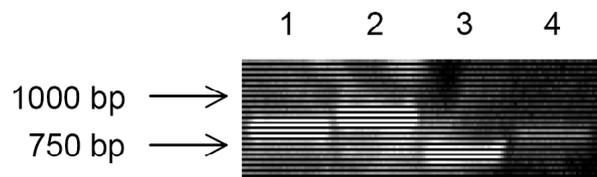
Mit den fünf durchsequenzierten Plasmiden der humanen und murinen GNE1, humanen und murinen GNE2 und humanen GNE3 wurden *E.coli* DH10BAC<sup>TM</sup>-Zellen für die Herstellung der Bacmid-DNA transformiert. Dabei wurden die Gene durch homologe Rekombination in die Bacmid-DNA integriert. Nach der Blau-Weiß-Selektion konnte von den positiven Klonen das Bacmid isoliert werden.

Für die Expression der Isoformen in Insektenzellen mußte zu Beginn der Baculovirus hergestellt werden. Dazu wurden *Sf9*-Zellen mit der Bacmid-DNA transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation konnte der Transfektionsüberstand, indem sich der Virus befand, geerntet werden. Um den Titer des Virus zu erhöhen, erfolgte eine zweimalige Amplifikation des Transfektionsüberstands. Um zu überprüfen, ob aktiver Virus gebildet wurde, wurden zunächst die Zellen pelletiert, aufgeschlossen und das

## Ergebnisse

---

Lysat wurde auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivität getestet. Im Lysat konnten bis auf hGNE3 für alle Isoformen beide Aktivitäten nachgewiesen werden. Für hGNE3 konnte nur eine geringe Kinaseaktivität gemessen werden. Zum anderen wurde durch eine PCR Virus im Virusüberstand (Erststock) nachgewiesen. Der Erststock wurde mit SDS und Proteinase K behandelt und anschließend wurde die DNA über eine NucleoSpin®-Säule aufgereinigt. Die Eluate dienten als Template für die PCR. Für den humanen Virus wurden der Forward-Primer pFASTBAC-For und der Reverse-Primer hGNEA-Rev und für den murinen Virus der Forward-Primer pFASTBAC-For und der Reverse-Primer mGNE-Rev eingesetzt. Bis auf hGNE3 konnte für alle Konstrukte ein PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 25) und daher geeigneter Virus für die Proteinexpression nachgewiesen werden.



**Abbildung 25: PCR-Analyse zum Nachweis von Virus im Erststock.** (1) hGNE1, (2) hGNE2, (3) mGNE1, (4) mGNE2.

Zur Klonierung der Viren, wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Ein Plaque-Assay ist eigentlich ein Verfahren, zur Bestimmung des Virustiters. Dabei werden adhärierende *Sf9*-Zellen unterschiedlichen Virusverdünnungen ausgesetzt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit kommt es dann zur Lyse von infizierten Zellen und deren unmittelbaren Nachbarzellen. Anschließend wird der Zellrasen gefärbt und man erkennt diese Lyse an leeren, ungefärbten Stellen (Plaques). Diese Plaques werden gezählt und dienen als Maß für die Menge an infektiösen Viren. Die Angabe der Viruskonzentration erfolgt entweder als PFU (*Plaque-forming units*)/ml oder als MOI (*Multiplicity of infection*). Zur Klonierung wurden die Plaques ausgestochen und neue *Sf9*-Zellen infiziert. Nach zweimaliger Virusamplifikation wurden schließlich die optimalen Expressionsbedingungen ermittelt. Dazu wurden Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Erststock infiziert. Die Zellen wurden wiederum pelletiert, aufgeschlossen und die Epimerase- und Kinaseaktivität wurde gemessen. Bis auf hGNE3 konnten bei den einzelnen humanen und murinen GNE-Isoformen keine unterschiedlichen Expressionsraten bei den unterschiedlichen Virusmengen ermittelt werden. Zusätzlich wurde die Expressionsrate über eine SDS-PAGE mit

anschließender Silberfärbung kontrolliert. Für human und murin GNE1 bzw. GNE2 konnte eine deutliche Überexpression gezeigt werden. Es waren keine Unterschiede bei den unterschiedlichen Virusmengen sichtbar. Daher wurden für die folgenden Infektionen die geringsten getesteten Viruskonzentrationen (500 µl Erststock für 20 ml *Sf900*-Zellen) eingesetzt. Für hGNE3 wurde keine Überexpression beobachtet. Daher wurde für hGNE3 in den folgenden Versuchen das maximal mögliche Volumen von 10 ml Erststock für 100 ml *Sf900*-Zellen eingesetzt.

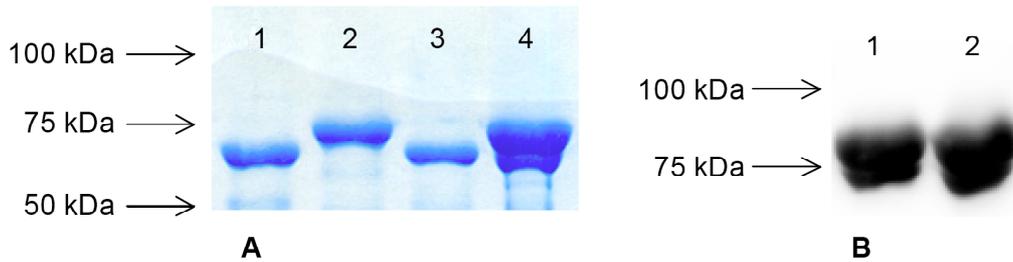
### **3.1.4.3. Expression und Reinigung der humanen und murinen GNE-Isoformen**

Die Proteinexpression wurde sowohl in *Sf900*- als auch in *High Five*-Zellen durchgeführt. Nach einer Infektionszeit von 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und je nach Volumina mittels einer Spritze oder durch die French-Press aufgeschlossen. Die durch eine weitere Zentrifugation erhaltene lösliche Fraktion des Zelllysats wurde über eine Ni-NTA-Agarose chromatographiert. Bei dieser Affinitätschromatographie bindet der spezifische Ligand der rekombinanten Proteine, der 6xHis-Tag, an die Ni-NTA-Agarose und die Proteine können so von Verunreinigungen getrennt werden. Da die Elution mit imidazolhaltigem Puffer, der die Funktion der GNE negativ beeinflusst, erfolgte, wurden die Proben anschließend durch PD10-Chromatographie umgepuffert. Die gepoolten proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend in einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 26A). Die Überexpression in *Sf900*-Zellen und die Reinigung über die Ni-NTA-Agarose waren für hGNE1, hGNE2, mGNE1 und mGNE2 erfolgreich. Der Reinheitsgrad der Proben lag deutlich über 95%. Desweiteren machte es keinen signifikanten Unterschied, ob die Proteine in *Sf900*- oder *High Five*-Zellen exprimiert wurden. Für humaner und muriner GNE1 konnte jeweils eine Bande von 70 kDa und für die humane bzw. murine GNE2 jeweils eine Bande von 75 kDa detektiert werden, was mit den molekularen Massen, die aus den cDNA-Sequenzen vorhergesagt werden konnten, gut übereinstimmt. Wie oben beschrieben, besitzt die GNE2 einen verlängerten N-Terminus, was den Shift von 5 kDa gegenüber der GNE1-Isoform erklärt. Die humane GNE3 konnte mittels Coomassie-Färbung nicht nachgewiesen werden. Daher wurden die Proben noch einmal in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung, die wesentlich sensitiver als die Coomassie-Färbung ist, analysiert. Für hGNE3 wurde wiederum keine Bande der erwarteten Größe detektiert, was zu dem Ergebnis führt, daß human GNE3 sich in Insektenzellen nicht funktionell exprimieren läßt. Mehr als 95% des exprimierten Proteins wurden in der

## Ergebnisse

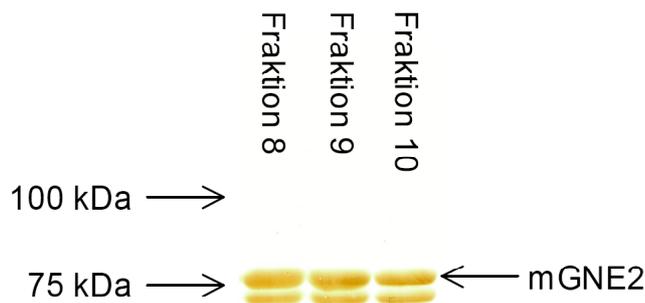
unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation gefunden.

Wie in Abb. 26A zu sehen ist, wurde mGNE2 als Doppelbande exprimiert. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper durchgeführt (Abb. 26B). Der Western-Blot zeigt das gleiche Ergebnis, wie die SDS-PAGE. Die obere Bande hat eine Größe von 75 kDa, was durch die cDNA-Sequenz vorhergesagt wird. Die untere Bande, mit einer Größe von 70 kDa, entspricht der mGNE1-Isoform.



**Abbildung 26: (A) Expression der humanen und murinen GNE Isoformen.** Die Proteine wurden über das Baculovirussystem in Insekten(*Sf900*)-Zellen exprimiert, durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. (1) hGNE1; (2) hGNE2; (3) mGNE1; (4) mGNE2. **(B) Western-Blot-Analyse von mGNE2.** mGNE2 wurde über das Baculovirussystem in Insekten(*Sf900*)-Zellen exprimiert und durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zwei repräsentative Fraktionen wurden mittels Western-Blot und anschließender Immunodetektion mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper analysiert. (1) Fraktion 3; (2) Fraktion 4.

Es mußte eindeutig geklärt werden, ob beide Banden der mGNE2-Isoform entsprechen. Dazu wurde ein Peptide-Mass-Fingerprint durchgeführt. mGNE2 wurde in Insektenzellen exprimiert, über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt und in einer anschließenden SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert (Abb. 27). Die zwei Banden wurden ausgeschnitten, entfärbt und tryptisch verdaut. Aus dem dann aufgenommenen MALDI-MS-Spektrum wurde eine Peak-Liste extrahiert, mit der dann eine Internet-basierte Suche über Mascot durchgeführt wurde. Für beide Banden konnten Peptide aus mGNE2 gefunden werden (Abb. 28).



**Abbildung 27: Aufgereinigte mGNE2 in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung.** mGNE2 wurde in Insektenzellen exprimiert und über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Beide Banden wurden ausgeschnitten, entfärbt und tryptisch verdaut. Die anschließende MALDI-MS-Analyse wurde von Mitarbeitern der ET-Protein Chemistry der Schering AG durchgeführt.

## Bande 01

Accession: ID222  
Proteinname: mGNE2

### Protein sequence (762 aa)

```

10           20           30           40           50
METHAHLHRE QSYACPHELY FKKLSSKKKQ VMEKNCNNRK LRVCVATCNR
60           70           80           90          100
ADYSK LAPIM FGIKTEPAFF ELDVVVLGSH LIDDYGNTYR MIEQDDFDIN
110          120          130          140          150
TRLHTIVRGE DEAAAMVESVG LALVKLPDVL NRLKPDIMIV HGDRFDALAL
160          170          180          190          200
ATSAALMNIR ILHIECCEVS CTIDDSIRHA ITKLAHYHVC CTRSAEQHLI
210          220          230          240          250
SMCEDHDRIL LAGCPSYDKL LSAKNDYMS IIRMWLGDDV KCKDYIVALQ
260          270          280          290          300
HPVTTDIKHS IKMFELTLDA LISFNKRTL V LFPNIDAGSK EMVVRMRKKG
310          320          330          340          350
IEHHPNFRVAV KHVPPDQFIQ LVAHAGCMIG NSSCGVREVG AFGTPVINLG
360          370          380          390          400
TRQIGRETGE NVLHVRDADT QDKILQALHL QFGKQYPCSK IYGDGNAVPR
410          420          430          440          450
ILKFLKSIDL QEPLQKKFCF PPVKENISQD IDHILETLISA LAVDLGGTNL
460          470          480          490          500
RVAIVSMKGE IVKKYIQFNP KTYEERISLI LQMCVEAAAE AVKLNCRILC
510          520          530          540          550
VGISTGGRVYN PQEGVVLHST KLIQEWNSVD LRTPLSDTLH LPVWVDNDGN
560          570          580          590          600
CAAMAERKFG QKGQENFVT LITGTGIGGG IIHQHELIHG SSFCAEELGH
610          620          630          640          650
LVVSLDCPDC SCCSHCCIEA YASCMALQRE AKKLHDEDDL LVEGMSVPKD
660          670          680          690          700
EAVGALHLIQ AAKLGNVKAQ SILRTAGTAL GLGVVNILHT MNPSLVILSG
710          720          730          740          750
VLASHYIHIV KDVI RQQALS SVQD VDVVVVS DLVDPALLGA ASMVLDTYTR
760
RIHPIIDHHHH III
  
```

(grey = MS, green = MS/MS)

## Bande 02

Accession: ID222  
Proteinname: mGNE2

### Protein sequence (762 aa)

```

10           20           30           40           50
METHAHLHRE QSYACPHELY FKKLSSKKKQ VMEKNCNNRK LRVCVATCNR
60           70           80           90          100
ADYSK LAPIM FGIKTEPAFF ELDVVVLGSH LIDDYGNTYR MIEQDDFDIN
110          120          130          140          150
TRLHTIVRGE DEAAAMVESVG LALVKLPDVL NRLKPDIMIV HGDRFDALAL
160          170          180          190          200
ATSAALMNIR ILHIECCEVS CTIDDSIRHA ITKLAHYHVC CTRSAEQHLI
210          220          230          240          250
SMCEDHDRIL LAGCPSYDKL LSAKNDYMS IIRMWLGDDV KCKDYIVALQ
260          270          280          290          300
HPVTTDIKHS IKMFELTLDA LISFNKRTL V LFPNIDAGSK EMVVRMRKKG
310          320          330          340          350
IEHHPNFRVAV KHVPPDQFIQ LVAHAGCMIG NSSCGVREVG AFGTPVINLG
360          370          380          390          400
TRQIGRETGE NVLHVRDADT QDKILQALHL QFGKQYPCSK IYGDGNAVPR
410          420          430          440          450
ILKFLKSIDL QEPLQKKFCF PPVKENISQD IDHILETLISA LAVDLGGTNL
460          470          480          490          500
RVAIVSMKGE IVKKYIQFNP KTYEERISLI LQMCVEAAAE AVKLNCRILC
510          520          530          540          550
VGISTGGRVYN PQEGVVLHST KLIQEWNSVD LRTPLSDTLH LPVWVDNDGN
560          570          580          590          600
CAAMAERKFG QKGQENFVT LITGTGIGGG IIHQHELIHG SSFCAEELGH
610          620          630          640          650
LVVSLDCPDC SCCSHCCIEA YASCMALQRE AKKLHDEDDL LVEGMSVPKD
660          670          680          690          700
EAVGALHLIQ AAKLGNVKAQ SILRTAGTAL GLGVVNILHT MNPSLVILSG
710          720          730          740          750
VLASHYIHIV KDVI RQQALS SVQD VDVVVVS DLVDPALLGA ASMVLDTYTR
760
RIHPIIDHHHH III
  
```

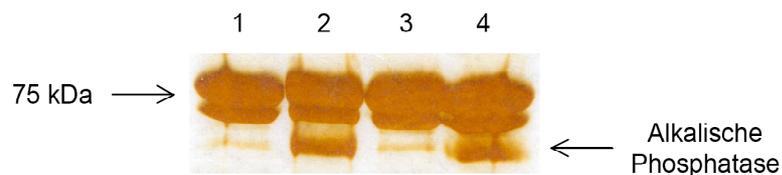
(grey = MS, green = MS/MS)

**Abbildung 28: MALDI-MS-Analyse zur Identifizierung der mGNE2-Doppelbande.** Die silbergefärbten Banden wurden ausgeschnitten, entfärbt und tryptisch verdaut. Für die in Abb. 27 obere Bande (Bande 01) wurden 13 Peptide gefunden. Etwa 20% der Aminosäuren von mGNE2 konnten identifiziert werden. Für die untere Bande (Bande 02) wurden 11 Peptide gefunden. Etwa 17% der Aminosäuren von mGNE2 konnten identifiziert werden. Sowohl die obere, als auch die untere Bande entsprechen mGNE2.

Man kann davon ausgehen, daß es sich bei beiden Banden um die mGNE2-Isoform

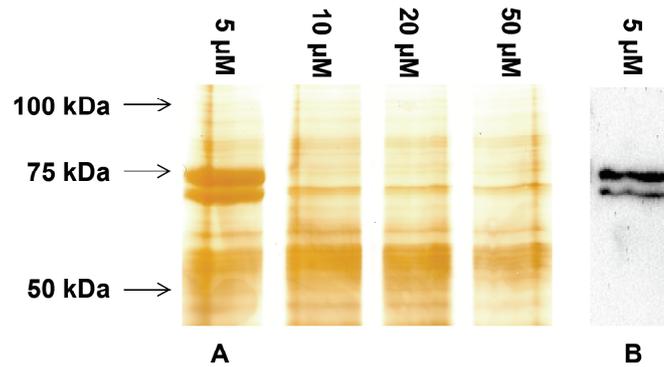
## Ergebnisse

handelt. Eine Doppelbande kann wiederum bedeuten, daß das Protein in zwei unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vorliegt. Die Behandlung der Proteinproben mit alkalischer Phosphatase sollte dazu führen, daß Phosphatgruppen von den Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten abgespalten werden und aus der Doppelbande eine einzelne distinkte Bande wird. Dieses Experiment führte aber zu dem Ergebnis, daß mGNE2 einheitlich phosphoryliert wird und nicht wie angenommen in verschiedenen Phosphorylierungszuständen vorliegt (Abb. 29).



**Abbildung 29: Behandlung aufgereinigter mGNE2-Fractionen mit alkalischer Phosphatase.** mGNE2 wurde in Insektenzellen exprimiert, über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Die Behandlung zeigte keinen Einfluß, die Doppelbande liegt noch vor. (1) Fraktion 3 ohne Phosphatase; (2) Fraktion 3 mit Phosphatase; (3) Fraktion 4 ohne Phosphatase; (4) Fraktion 4 mit Phosphatase.

Die untere Bande könnte auch ein Abbauprodukt des mGNE2-Proteins sein. Deshalb erfolgte als nächster Schritt die Proteinexpression in Insektenzellen und die Aufarbeitung in Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren wie Trasylol und MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) durchzuführen. Die Expression von mGNE2 in Gegenwart von Trasylol zeigte keinen Einfluß. Die SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung zeigte die gleiche unveränderte Doppelbande in den Lysaten bei unterschiedlicher Trasylol-Konzentration (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde mGNE2 in *Sf900*-Zellen mit unterschiedlichen MG132-Konzentrationen exprimiert. Nach einer Infektionszeit von 48 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mittels einer French-Press aufgeschlossen. Die Lysate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Die Behandlung mit MG132 führte tatsächlich dazu, daß die Doppelbande mit zunehmender MG132-Konzentration verschwand, was aber auch mit einer beträchtlichen Reduzierung der Expressionsrate einherging (Abb. 30).

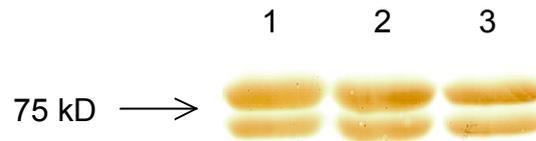


**Abbildung 30: (A) SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung von in Anwesenheit von MG132 exprimierter mGNE2.** mGNE2 wurde in *Sf900*-Zellen exprimiert. Es wurden vier verschiedene MG132-Konzentrationen eingesetzt. Mit zunehmender Inhibitor-Konzentration wird die Doppelbande reduziert, was aber mit einem drastischen Verlust in der Proteinausbeute einhergeht. **(B) α-His-Western-Blot.** Bei beiden Banden handelt es sich um die mGNE2-Isoform.

Die untere Bande mit einer Größe von 70 kDa könnte auch dem mGNE1-Protein entsprechen. Die MALDI-MS-Analyse gab in der Hinsicht nicht genügend Aufschluß darüber, da kein mGNE2-spezifisches Peptid gefunden wurde. Die cDNA-Sequenz von GNE2 enthält downstream ein zweites, alternatives Startcodon, welches dem GNE1-Startcodon äquivalent ist. Dies könnte in der Expression des Proteins mit der Größe der unteren Bande resultieren. Aus diesem Grund wurde das alternative Startcodon (M32) in ein Codon für Alanin mutiert, so daß die Mutante mGNE2 M32A generiert wurde. Dazu wurden die Primer MutmGNE2-For und MutmGNE2-Rev verwendet. Nach Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Durch Transformation von *E.coli* DH10BAC<sup>TM</sup>-Zellen wurde die Bacmid-DNA generiert und für die Virusherstellung *Sf9*-Zellen transfiziert. Nach zweimaliger Virusamplifikation und Proteinexpression in *Sf900*-Zellen konnte das mutierte Protein analysiert werden. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen, das Protein wurde über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt und in einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 31). Die Expression von mGNE2 M32A resultierte immer noch in einer Doppelbande. Das Verhältnis zwischen obere und untere Bande hat sich nicht verändert. Da die verschiedenen Ansätze keine Änderung in der Expression des Proteins brachten, wurde mit dem mGNE2-Protein weitergearbeitet.

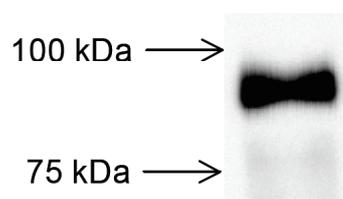
## Ergebnisse

---



**Abbildung 31: Aufgereinigte mGNE2-Mutante M32A in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung.** mGNE2 M32A wurde in Insektenzellen exprimiert und über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Drei nach der Gelfiltration erhaltene Fraktionen wurden analysiert.

Da hGNE3 sich nicht in Insektenzellen exprimieren ließ, wurde die entsprechende cDNA in den pGEX<sup>TM</sup>-4T-1-Vektor, einen Expressionsvektor von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen GST-Tag in *E.coli*-Zellen, umklontiert. Das cDNA-Konstrukt pCR<sup>®</sup>-Blunt-hGNE3-His wurde als Template und die degenerierten Primer hGNE3EC-For und hGNE3EC-Rev, die die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI bzw. NotI enthalten, für die Klonierungs-PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen in den pGEX<sup>TM</sup>-4T-1-Vektor ligiert. Nach der Transformation von *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen konnte die hGNE3 exprimiert werden. Da bei der Expression ein GST-Fusionsprotein entsteht, konnte das Protein über eine GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung zeigt eine prominente Bande bei einer Größe von 95 kDa. Allerdings zeigte sich auch, daß 95% des Proteins sich in der unlöslichen Fraktion, nach Zellaufschluß und Zentrifugation befinden. Eine Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -GST-Antikörper bestätigte die SDS-PAGE-Analyse (Abb. 32).



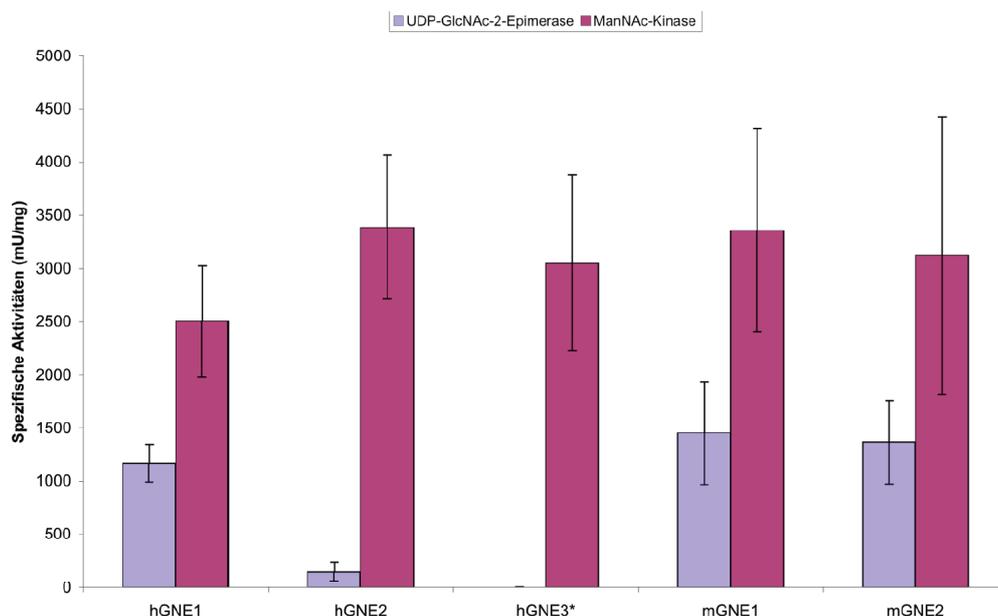
**Abbildung 32:  $\alpha$ -GST-Western-Blot von hGNE3-Eluat.** hGNE3 wurde in *E.coli* (BL21)-Zellen exprimiert. Das Fusionsprotein wurde durch eine Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -GST-Antikörper analysiert.

### 3.1.5. Charakterisierung der humanen und murinen GNE-Isoformen

Im nächsten Schritt wurden die Epimerase- sowie Kinaseaktivitäten der gereinigten humanen und murinen GNE-Isoformen bestimmt. Dazu wurden die in Insektenzellen exprimierten Proteine über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und über eine PD10-Säule umgepuffert. Die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen wurden für

den Epimerase- bzw. Kinaseassay eingesetzt. Für die hGNE1 wurde eine spezifische Aktivität für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase von etwa 1100 mU/mg bestimmt (Abb. 33). Dieser Wert der GNE1 stimmt mit der Aktivität der ebenfalls in Insektenzellen exprimierten humanen GNE1 mit N-terminalen His-Tag (etwa 1500 mU/mg; Hinderlich *et al.*, 2004) gut überein. Bei hGNE2 ist die spezifische Aktivität um etwa 80% reduziert. Für die hGNE3, die in *E.coli* BL21-Zellen exprimiert wurde, konnte keine Epimeraseaktivität gemessen werden. Die Epimeraseaktivitäten der murinen GNE-Isoformen entsprechen der von hGNE1 (Abb. 33). Im Gegensatz zu hGNE2 konnte keine Reduktion der Aktivität von mGNE2 beobachtet werden.

Bei dem ManNAc-Kinase-Assay wurde für hGNE1 eine spezifische Aktivität von etwa 2100 mU/mg bestimmt (Abb. 33), was wiederum mit den Werten der Expression der N-terminalen His-getagten humanen GNE1 (etwa 2500 mU/mg; Hinderlich *et al.*, 2004) sehr gut übereinstimmt. Die spezifischen Kinaseaktivitäten von hGNE2, hGNE3, mGNE1 und mGNE2 liegen alle in derselben Größenordnung (Abb. 33).



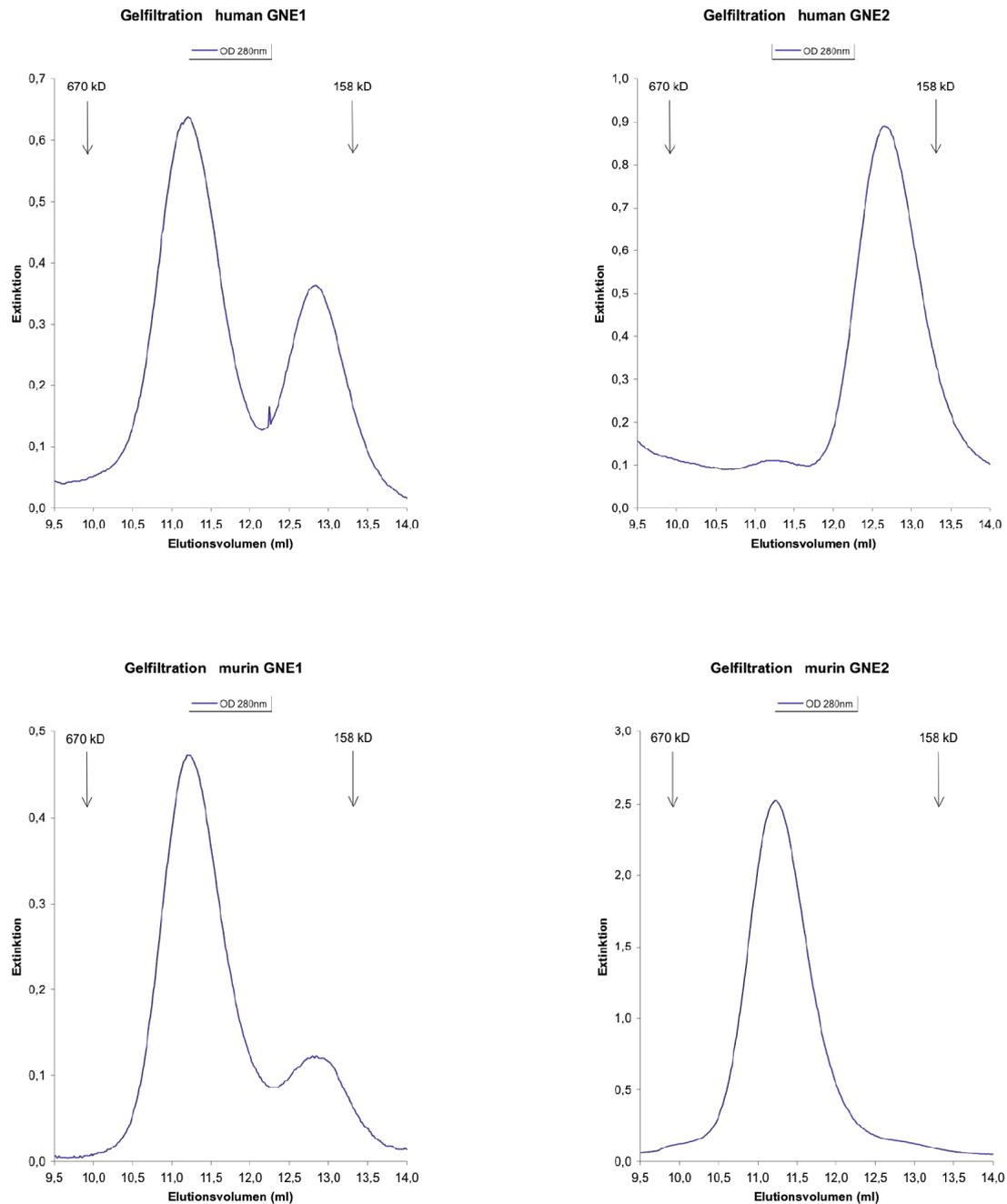
**Abbildung 33: UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivitäten der gereinigten GNE-Isoformen.** Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus acht unabhängigen Experimenten. \*hGNE3 wurde in *E.coli* BL21-Zellen exprimiert.

Desweiteren sollte der oligomere Zustand der einzelnen GNE-Isoformen durch Gelfiltrationsanalysen analysiert werden. Durch zwei verschiedene biophysikalische Methoden, Analytische Ultrazentrifugation und Dynamische Lichtstreuung, konnten Ghaderi *et al.* zeigen, daß die humane GNE1 nicht, wie ursprünglich angenommen

## Ergebnisse

---

als Hexamer und Dimer (Hinderlich *et al.*, 1997), sondern als Tetramer und Dimer existiert, wobei das Tetramer sowohl die Epimerase- als auch die Kinaseaktivität besitzt, wohingegen das Dimer nur die Kinaseaktivität aufweist. Diese Ergebnisse wurden durch Gelfiltrationsanalysen bestätigt (Abb. 34). Aufgereinigte rekombinante humane und murine GNE1 existieren als Tetramer und Dimer im Verhältnis 3:1 bzw. 4:1. Die humane GNE2 liegt zu fast 90% als Dimer vor, wohingegen die murine GNE2 zu fast 90% als Tetramer vorliegt. Die Quartärstruktur für die hGNE3 über die Gelfiltration zu bestimmen erwies sich als schwierig, da die Expression in *E.coli*-Zellen keine hohe Proteinausbeute ergab und damit im Chromatogramm keine auswertbaren Peaks zu erkennen waren.

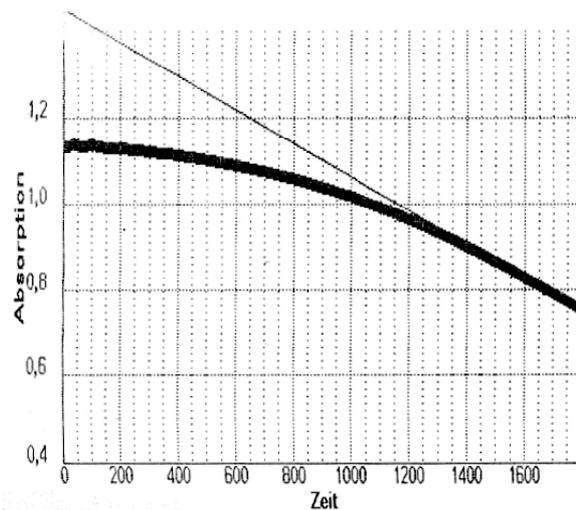


**Abbildung 34: Gelfiltrationsanalysen der gereinigten GNE-Isoformen.** Die aufgereinigten Proteine wurden über eine Sephadex<sup>®</sup>200-Säule analysiert. Die Pfeile zeigen das Elutionsvolumen der Standardproteine (Thyroglobulin 670 kDa, IgG 158 kDa) an.

Die Gelfiltration zeigt, daß hGNE2 als Dimer existiert, aber trotzdem eine Epimeraseaktivität vorhanden ist. Hinderlich *et al.* (1997) zeigten für hGNE1 in einem gekoppelten-optischen Test, daß bei Anwesenheit des Substrates UDP-GlcNAc das Dimer sich in das Tetramer zurückbilden und somit wieder Epimeraseaktivität nachgewiesen werden kann. hGNE2 wurde daher in *Sf900*-Zellen exprimiert, die

## Ergebnisse

Zellen wurden aufgeschlossen und hGNE2 wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Mit den Dimerfraktionen wurde der gekoppelt-optische Enzymtest durchgeführt. Die Rückbildung des Tetramers und die damit ansteigende Epimeraseaktivität sollte mit fortschreitender Reaktionszeit zu einer immer stärker werdenden Abnahme des Edukts NADH führen. Genau dies wurde für die Dimerpopulation von hGNE2 beobachtet. Das Dimer assoziiert in Anwesenheit von UDP-GlcNAc zum Tetramer und erklärt somit die beobachtete Epimeraseaktivität von hGNE2 (Abb. 35).

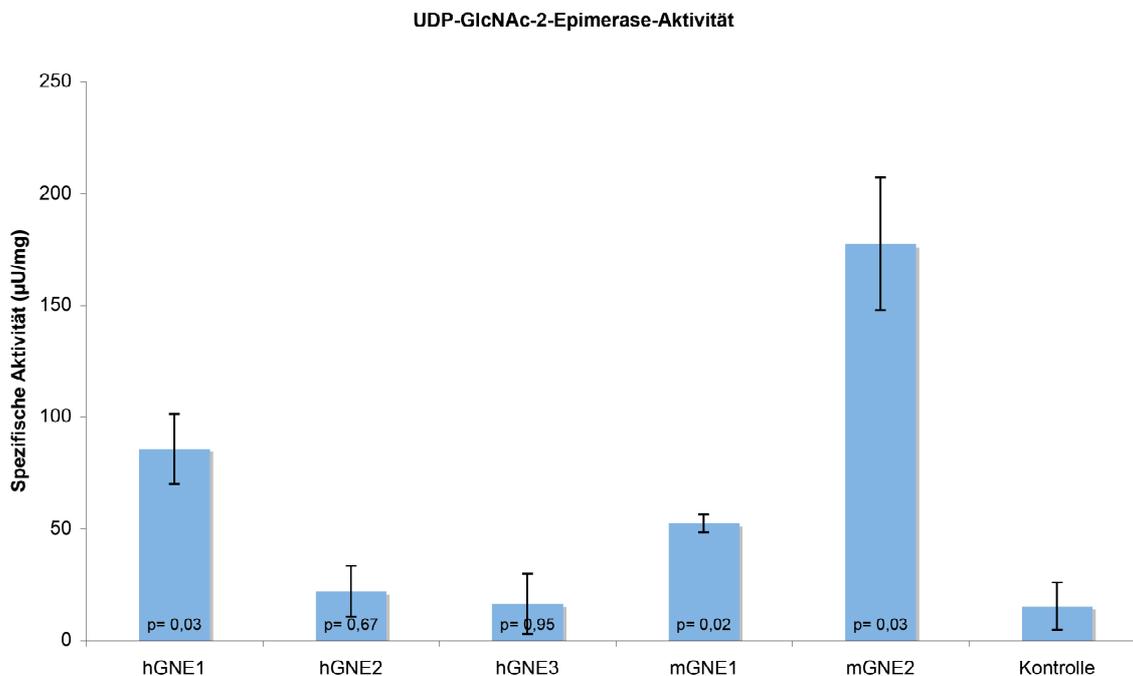


**Abbildung 35: Gekoppelt-optischer Enzymtest zur hGNE2-Tetramer-Rückbildung.** In Anwesenheit des Substrats UDP-GlcNAc bildet sich das hGNE2-Dimer zurück zum Tetramer. Die Rückbildung wird über die mit zunehmender Inkubationszeit verstärkte Abnahme der NADH-Konzentration nachgewiesen.

### 3.1.6. Transiente Proteinexpression in GNE-defiziente CHO-Lec3-Zellen

Um die Ergebnisse der Proteinexpression in Insektenzellen zu verifizieren, sollten die Isoformen in Säugerzellen transient exprimiert und anschließend die Epimeraseaktivität bestimmt werden. Da die exprimierten Proteine in diesen Experimenten nicht aufgereinigt werden konnten, konnte die Kinaseaktivität aufgrund hoher Hintergrundaktivität nicht ermittelt werden. Für die transiente Proteinexpression wurden die GNE-Varianten aus dem pFASTBAC™ 1-Vektor mit Sall und KpnI herausgeschnitten und in den pUMVC3-Vektor (Aldevron), einen Säugerzell-Expressionsvektor, ligiert. Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurden die Plasmide isoliert und ansequenziert. GNE-defiziente CHO-Zellen (Lec3; Stanley *et al.*, 1981; Hong *et al.*, 2003) wurden mit der Plasmid-DNA mittels TransFectin™ transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Mit den Lysaten wurde ein radiometrischer UDP-

GlcNAc-2-Epimerase-Assay durchgeführt (Abb. 36). Die Tendenz der Epimeraseaktivitäten ist vergleichbar mit der der rekombinant exprimierten Proteine (s. Abb. 33). Die humane und murine GNE1 haben eine spezifische Aktivität in derselben Größenordnung, wohingegen die Epimeraseaktivität von mGNE2 im Vergleich zu hGNE1 bzw. mGNE1 um etwa das Doppelte gestiegen ist. hGNE2 zeigt eine um etwa 75% verminderte Epimeraseaktivität im Vergleich zu hGNE1. Um zu bestimmen, ob die Aktivitäten der GNE-Isoformen signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle sind, wurde mit den Daten ein T-Test durchgeführt und der p-Wert ermittelt (Abb. 36). Für hGNE2 wurde ein p-Wert von 0,67 und für hGNE3 ein p-Wert von 0,95 errechnet, was zeigt, daß die beobachtete Epimeraseaktivität sich nicht signifikant von der Hintergrundaktivität unterscheidet. Alle übrigen beobachteten Epimeraseaktivitäten unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle.



**Abbildung 36: Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay der in CHO-Lec3-Zellen exprimierten GNE-Isoformen.** Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

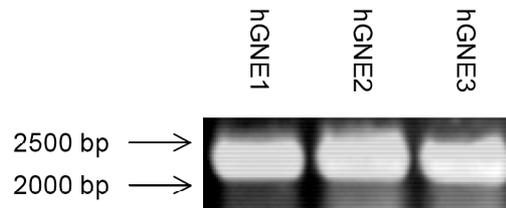
### 3.1.7. Stabile Transfektion von BJA-B K20-Zellen und Etablierung GNE-Isoformen-spezifischer Zelllinien

In diesen Experimenten sollten durch Transfektion und Subklonierung stabile Zelllinien der humanen GNE-Isoformen hergestellt werden. Dazu wurden als Erstes die dazu erforderlichen cDNA-Konstrukte in den pcDNA3.1/V5-His-Vektor, einem

## Ergebnisse

---

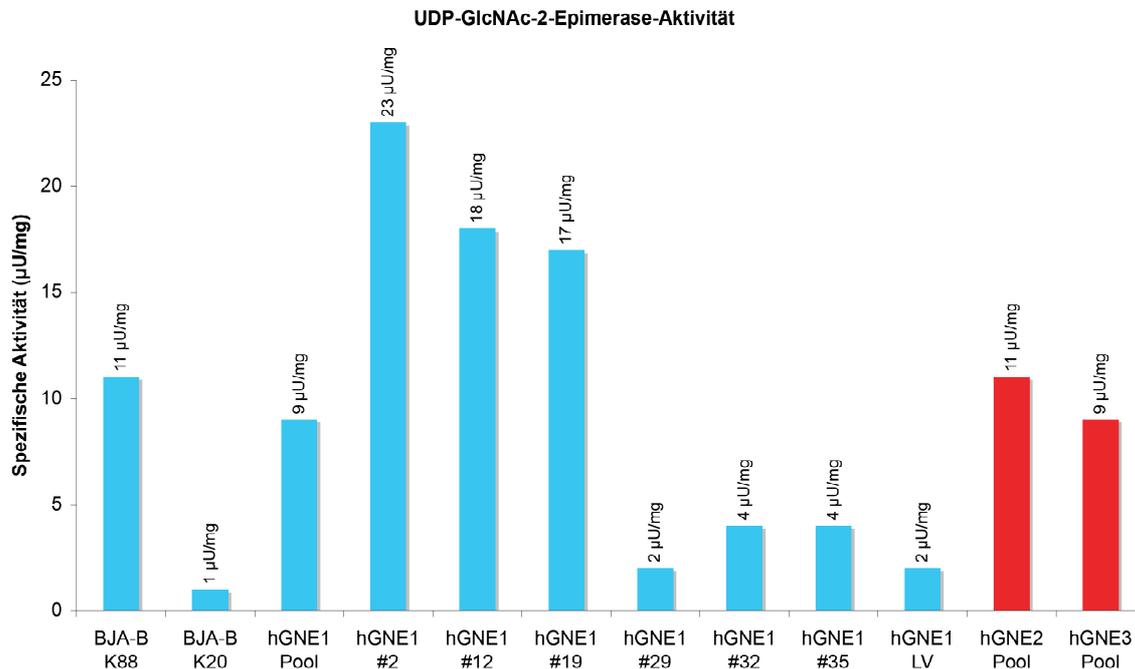
Expressionsvektor für Säugerzellen, kloniert. Als Template für die Klonierungs-PCR dienten jeweils hGNE1, hGNE2 und hGNE3 im pCR®-Blunt-Vektor. Für die Amplifikation wurden die Forward-Primer SZGNE1-For, SZGNE2-For bzw. SZGNE3-For, sowie der Reverse-Primer SZGNE-Rev eingesetzt. Die PCR-Produkte (Abb. 37) wurden über eine TOPO-Ligation in den pcDNA3.1/V5-His-Vektor kloniert.



**Abbildung 37: Amplifikation der cDNA-Konstrukte der GNE-Isoformen.**

Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurden eine Kolonie-PCR durchgeführt, um positive Klone zu identifizieren. Die Plasmide der positiven Klone wurden mittels DNA-Maxipräparation isoliert und durchsequenziert. Anschließend wurden *BJA-B* K20-Zellen, ein GNE-defizienter Subklon dieser humanen B-Lymphom-Zelllinie, mittels Elektroporation transfiziert. Nach 48 Stunden wurde ein Teil der Zellen geerntet, aufgeschlossen und auf ihre Aktivität hin durch den radiometrischen Epimeraseassay untersucht. Der zweite Teil der transfizierten Zellen wurde für 14 Tage durch Zugabe von Geneticin (G418) selektioniert. Nach der Selektion wurde wiederum die Epimeraseaktivität der jeweiligen GNE-Pools bestimmt. Anschließend wurden einzelne Zellklone durch limitierte Verdünnung isoliert. Nach Erreichen einer definierten Zellzahl wurden die Klone ebenfalls auf ihre Aktivität hin überprüft. Die *BJA-B* K20-Zellen konnten mit den human GNE-Isoformen stabil transfiziert werden (Abb. 38). In den Pools von hGNE1, hGNE2 und hGNE3 konnte GNE-Aktivität gegenüber den untransfizierten und den mit Leervektor (LV) transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten *BJA-B* K88-Zellen, die endogene GNE1 besitzen. Es war weiterhin möglich stabile Zellklone (#2, #12 und #19) aus dem hGNE1-Pool zu isolieren und zu einer stabilen Zelllinie zu etablieren. Für die einzelnen hGNE1-Klone konnte eine signifikante spezifische Epimeraseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 38). Während für die *BJA-B* K88-Zellen eine spezifische Aktivität von 11  $\mu\text{U}/\text{mg}$  bestimmt wurde, lagen die Klone hGNE1 #2 (23  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ), hGNE1 #12 (18  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) und hGNE1 #19 (17  $\mu\text{U}/\text{mg}$ ) in ihrer spezifischen Aktivität um bis zu das Doppelte höher als die *BJA-B* K88-Zellen.

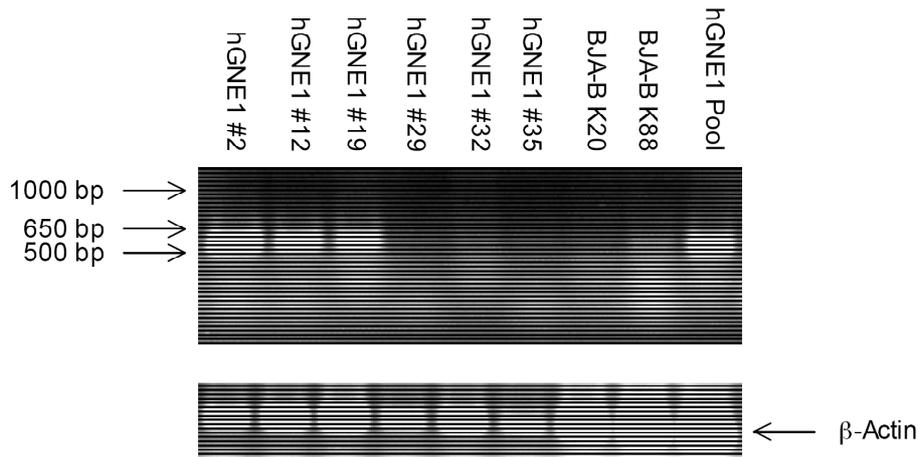
Allerdings war es nicht möglich aus dem hGNE2- bzw. hGNE3-Pool stabile Zelllinien zu etablieren.



**Abbildung 38: Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay der hGNE-Pools und einzelner hGNE1-Klone.** Die Klone #2, #12 und #19 exprimieren stabil hGNE1. Der hGNE2- und hGNE3-Pool zeigen Epimeraseaktivität.

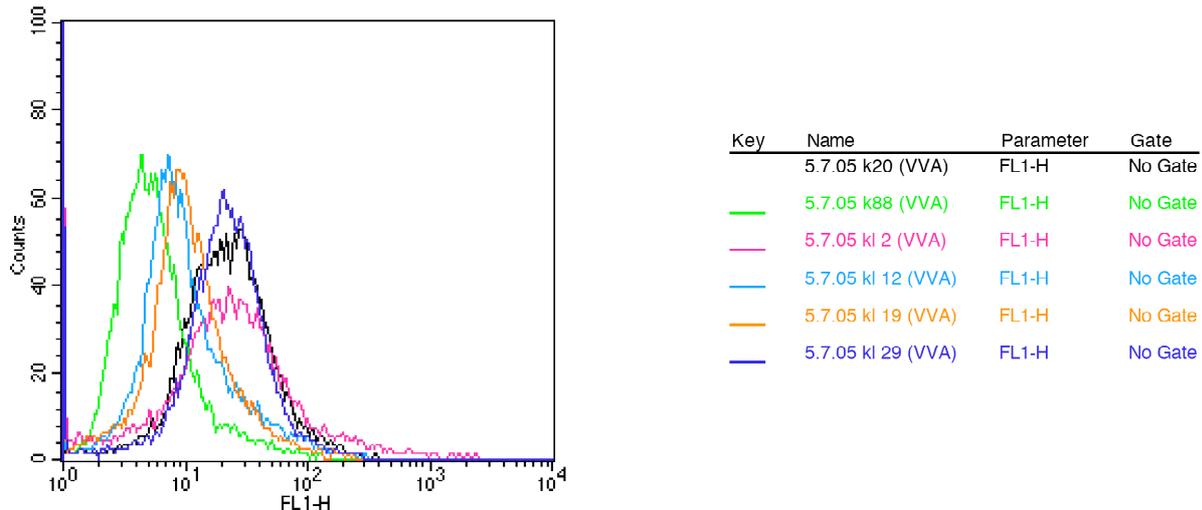
Zur Verifizierung der Ergebnisse sollte die Proteinexpression in den Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden Lysate der einzelnen Zelllinien hergestellt und in einem Western-Blot mit immunologischem Proteinnachweis analysiert. Allerdings war dies aufgrund einer zu niedrigen Expressionsrate und eines relativ unspezifischen Antikörpers nicht möglich. Stattdessen wurden die Zellen lysiert und die mRNA isoliert. In einer mit GNE-spezifischen Primern durchgeführten PCR sollte nachgewiesen werden, daß mit der Transfektion ein dauerhafter Einbau der GNE-DNA in das *BJA-B*-Genom stattgefunden hat. Die RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase über Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Template für die PCR diente. Für die Amplifikation wurde der Forward-Primer SZGNE1-For, sowie der Reverse-Primer hGNEA-Rev eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Forward-Primer bact1546s und der Reverse-Primer bact2553r für eine Amplifikation eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 39). Die in dem radiometrischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay positiven Klone (#2, #12, #19) zeigen auch in der Agarose-Gelelektrophorese ein positives Signal.

## Ergebnisse



**Abbildung 39: PCR-Analyse der mit hGNE1 transfizierten *BJA-B*-Zelllinien.** Im hGNE1-Pool und hGNE1 #2, #12 und #19 konnte eine Bande detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten *BJA-B* K88-Zellen. Um das Fehlen von mRNA bzw. cDNA auszuschließen, wurde in allen Proben  $\beta$ -Actin nachgewiesen.

Anschließend wurde mittels FACS-Analyse die Sialylierung von Glykokonjugaten an der Zelloberfläche untersucht. Da die drei humanen Isoformen unterschiedliche Epimeraseaktivitäten zeigen, sollte auch davon ausgegangen werden, daß ein dadurch verursachter unterschiedlicher intrazellulärer Sialinsäurepool in einer verschieden starken Oberflächensialylierung resultiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit dem Lektin VVA (*Vicia villosa* agglutinin) behandelt, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Es erkennt endständige Galactosen. Das Histogramm (Abb. 40) der FACS-Analyse mit dem VVA-Lektin zeigt, daß die hGNE1-Klone #2, #12 und #19 weniger endständige Galactose-Reste auf Glykokonjugaten aufweisen als der nicht stabil exprimierende hGNE1-Klon #29 und die untransfizierten GNE-defizienten *BJA-B* K20-Zellen. Daraus folgt, daß die stabil exprimierenden hGNE1-Klone #2, #12 und #19 mehr Sialinsäuren auf Glykokonjugaten der Zelloberfläche präsentieren.



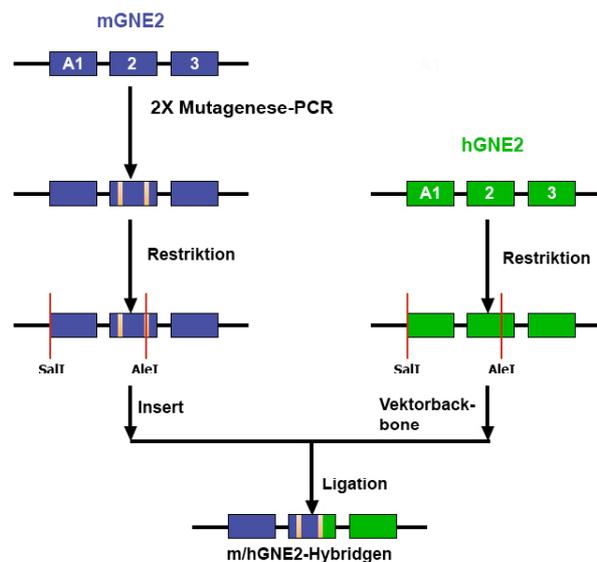
**Abbildung 40: Histogramm der FACS-Analyse mit VVA-Lektin.** Die in den vorherigen Experimenten als positiv getesteten hGNE1-Klone #2, #12 und #19 präsentieren weniger endständige Galactose-Reste auf ihren Glycokonjugaten der Zelloberfläche.

### 3.1.8. Expression und Charakterisierung eines GNE2-Hybridproteins

Um den Einfluß des N-Terminus von hGNE2 bzw. mGNE2 auf die funktionelle Epimeraseaktivität genauer zu untersuchen, wurde der N-Terminus von hGNE2 mit dem von mGNE2 ausgetauscht. Da im Übergang von Exon A1 zu Exon 2 keine adäquaten Schnittstellen für Restriktionsenzyme vorhanden waren, wurden die ersten 105 Aminosäuren von hGNE2 durch die von mGNE2 ersetzt (Abb 41). Für den Austausch mußte eine AclI-Schnittstelle geschaffen werden, weshalb ein Nucleotidaustausch von T nach g in Position 321 der cDNA von mGNE2 nötig war. Um zu gewährleisten, daß die ersten 31 Aminosäuren mGNE2 entsprechen und die restlichen Aminosäuren hGNE2, mußte ein weiterer Nucleotidaustausch von C nach A in Position 203 der cDNA von mGNE2 durchgeführt werden. Das hatte ein Aminosäureaustausch von Alanin (A) in Glutamat (E) an der Position 68 zur Folge. Jegliche anderen Unterschiede der cDNA-Sequenzen im gewählten Abschnitt von mGNE2 zu hGNE2 führten zu stillen Mutationen. Für die erste Mutagenese-PCR wurde der Forward-Primer MutHybrid1-For und der Reverse-Primer MutHybrid1-Rev verwendet, für die zweite Mutagenese-PCR der Forward-Primer MutHybrid2-For und der Reverse-Primer MutHybrid2-Rev. Als Template für die erste PCR wurde der pFASTBAC™ 1-mGNE2-Vektor (siehe oben) eingesetzt. Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen und Plasmid-DNA-Isolation wurde das Konstrukt zur Kontrolle durchsequenziert. Der N-Terminus von mGNE2 wurde mit

## Ergebnisse

den Restriktionsenzymen Sall und AelI (NEB) ausgeschnitten und in den pFASTBAC™ 1-hGNE2-Vektor (siehe oben) ligiert. Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen und Plasmid-DNA-Isolation wurde das GNE2-Hybridgen mit den Restriktionsenzymen Sall und KpnI aus dem pFASTBAC™ 1-Vektor ausgeschnitten und in den pUMVC3-Vektor ligiert. Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurden die Plasmide isoliert und ansequenziert. GNE-defiziente *CHO*-Zellen (Lec3) wurden mit der Plasmid-DNA mittels TransFectin™ transient transfiziert. Als Kontrolle wurden *CHO*-Lec3-Zellen mit hGNE2 und mGNE2 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Mit den Lysaten wurde ein radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay durchgeführt. Für das GNE2-Hybridprotein und hGNE2 konnten keine Epimeraseaktivitäten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In einem parallelen Kontrollansatz konnte für mGNE2 eine ähnliche Epimeraseaktivität, wie aus den vorherigen transienten Transfektionen (siehe 3.1.6.) ermittelt werden.



**Abbildung 41: Schematische Darstellung der Herstellung der cDNA des GNE2-Hybridproteins.** Dargestellt sind die N-Termini von mGNE2 bzw. hGNE2 mit den Exons A1, 2 und 3. Im Exon 2 wurden die Mutationen eingefügt. Der N-Terminus von mGNE2 (Insert) wurde in den hGNE2-Vektor (Vektor-Backbone) ligiert.