

IV Diskussion

Kohlenhydrate stellen mengenmäßig den größten Anteil der auf der Erde vorkommenden organischen Substanzen dar. Sie dienen nicht nur als Nahrungs- und Reservestoffe, sondern erfüllen zudem weitere vielfältige Funktionen. Kohlenhydrate dienen als Stütz- und Gerüstsubstanzen und sind zum einen Bestandteile von Nucleinsäuren und zum anderen von Glycoproteinen und Glycolipiden. Diese Glykokonjugate haben in der Zellbiologie eine herausragende Stellung. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl in Prozessen, wie Entwicklung, Differenzierung und Entzündungsreaktionen, aber auch in der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Ebenso sind sie für die Blutgruppen-Spezifität verantwortlich. Glycoproteine und Glycolipide sind Bestandteile der Zellmembran. Die meisten der von eukaryontischen Zellen sezernierten Proteine sind ebenfalls Glycoproteine. Ein wichtiger Bestandteil der kovalent an Glykokonjugate gebundenen Oligosaccharideinheiten ist die *N*-Acetylneuraminsäure. Sie ist der häufigste Vertreter der Sialinsäuren. Ein intakter Sialinsäurestoffwechsel ist für jeden Organismus essentiell, da die Sialinsäuren in Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen involviert oder für die Stabilität von Glycoproteinen verantwortlich sind. Der erste Schritt der Sialinsäurebiosynthese ist exergonisch und geschwindigkeitsbestimmend und wird von der GNE katalysiert.

Enzyme können aus einfachen biologischen Vorstufen Makromoleküle aufbauen, Nährstoffe abbauen und chemische Energie erzeugen. Sie haben neben ihren katalytischen Eigenschaften auch eine Vielzahl regulatorischer Funktionen. Durch hormonelle Signale können sie Einflüsse aus der Umwelt wahrnehmen und durch Änderung ihrer katalytischen Aktivität auf sie reagieren. In der Medizin haben die Enzyme eine große praktische Bedeutung. Ein Defekt oder sogar das völlige Fehlen eines oder mehrerer Enzyme führt zu einer ganzen Reihe von Krankheiten, vor allem Erbkrankheiten. Mutationen in der GNE führen zur erblichen Einschlußkörperchenmyopathie (h-IBM), die zu den entzündlichen Myopathien (Myositiden) gehört. Der Pathomechanismus dieser Krankheit ist bis heute unbekannt. Eine Hypothese zur Krankheitsursache besagt, daß bestimmte die Mutationen zu einem Verlust der Epimeraseaktivität der GNE führen und es somit innerhalb der Zelle zu einem CMP-Neu5Ac-Defizit kommt, so daß Glykokonjugate vermindert Sialinsäuren als endständige Komponenten der Oligosaccharidketten präsentieren. Die reduzierte Sialylierung von Proteinen wie z. B. Dystroglycan, die beim Aufbau des Muskels und

Diskussion

für die Muskelphysiologie essentiell sind, könnte zum Ausbruch der h-IBM führen. Dystroglycan besteht aus einer stark glycosylierten und sialylierten extrazellulären Untereinheit (α -Dystroglycan) und einer Transmembran-Untereinheit (β -Dystroglycan), die sich mit anderen membrangebundenen Proteinen zum Dystrophin-Glycoprotein-Komplex zusammenlagern. Die extrazelluläre α -Dystroglycan-Laminin-Interaktion einerseits und β -Dystroglycan-Aktin-Interaktion andererseits verbinden das Cytoskelett der Muskelzelle mit der extrazellulären Matrix und dienen somit der Strukturstabilisierung. Sowohl Mutationen im Laminin, als auch eine veränderte Glycosylierung des α -Dystroglycans führen zu einer gestörten Interaktion der Muskelzelle mit extrazellulären Matrixproteinen und sind pathologischer Hintergrund einiger kongenitaler Muskeldystrophien. Analog der Hypo-O-Mannosylierung als Ursache anderer Arten von Muskeldystrophien, könnte die Hyposialylierung eine Ursache der h-IBM sein. Eine weitere Hypothese dahingehend wäre, daß die Hyposialylierung zu Proteinen mit fehlerhafter Proteinfaltung führt, die dann als Amyloid-ähnliche Ablagerungen in den h-IBM-typischen „rimmed vacuoles“ erscheinen.

Eine andere Ursache, die zum Ausbruch der h-IBM führen könnte, wäre eine gestörte Interaktion der GNE mit anderen Proteinen. Neben der Funktion als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Sialinsäurebiosynthese scheint die GNE weitere regulatorische Funktionen zu besitzen. So ist sie für die Ontogenese essentiell. GNE-defiziente Mäuse zeigen eine frühe embryonale Letalität und sterben am Embryonaltag 8,5 (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Weidemann *et al.* (2006) konnten für die GNE mehrere Interaktionspartner mit dem Yeast-Two-Hybrid-System identifizieren. Zum einen das Collapsin Response Mediator Protein 1, welches ein cytoplasmatisches Phosphoprotein ist, das ausschließlich im Nervensystem und während der Entwicklung exprimiert wird. Es ist entscheidend für die neuronale Differenzierung und das axonale Wachstum. Zum anderen das Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein, welches ein Transkriptionsfaktor ist, der hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist.

In neueren Arbeiten von Wang *et al.* (2006) führte die Überexpression von rekombinanter GNE in HEK-Zellen zu einer Zunahme des RNA-Levels der Sialyltransferasen ST3Gal5 und ST8Sia1, und darausfolgend zu einer erhöhten Synthese der Ganglioside G_{M3} und G_{D3} . Die Synthese dieser Ganglioside induzierte wiederum entweder Apoptose, ausgelöst durch eine erhöhte BiP-Expression, oder

die Zellproliferation, ausgelöst durch eine ERK1/2-Phosphorylierung. In den HEK-Zellen konnte ebenfalls eine erhöhte Proliferation der Zellen durch die RNAi reduzierte GNE-Expression beobachtet werden. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, daß die GNE über die Sialinsäurebiosynthese hinaus weitere regulatorische Funktionen besitzt. Daher war es von großem Interesse mehr über diese Mechanismen oder eventuell vorhandene Interaktionspartner der GNE zu erfahren. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung neuer Isoformen der GNE, ihrer Klonierung, funktionellen Expression und Charakterisierung auf Proteinebene. Dabei sollte geklärt werden, ob die neuen Isoformen gewebspezifisch verteilt sind und einen Einfluß auf den Ausbruch der h-IBM haben könnten. Im zweiten Teil der Arbeit wurden mutmaßlich neue Protein-Interaktionen der GNE untersucht.

4.1. Identifikation neuer GNE-Isoformen und Analyse ihrer spezifischen Gewebsverteilungen

Watts *et al.* (2003) konnten bei Mutationsanalysen von Geweben von h-IBM-Patienten zeigen, daß es für die GNE mehrere Spleißvarianten gibt, aus denen unterschiedliche Isoformen resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine neue entsprechende Nomenklatur für die neuen Protein-Isoformen eingeführt. Das Vorkommen und die Verteilung der einzelnen Isoformen in verschiedenen Organismen wurde durch Datenbankanalysen untersucht. GNE1 konnte in allen untersuchten Organismen gefunden werden. Sialinsäuren sind Komponenten von Glykokonjugaten, die bei vielen physiologischen Prozessen eine essentielle Rolle spielen und ohne die ein Organismus nicht überlebensfähig ist. Die GNE ist daher für einen intakten Sialinsäurestoffwechsel notwendig. Bei allen untersuchten Primaten wurden die drei Isoformen wiedergefunden. Dagegen konnte sowohl bei Nagern als auch bei dem Huhn zwar GNE2 aber nicht GNE3 gefunden werden. Dem für die GNE2- und GNE3-Bildung notwendigen Exon A1 fehlte jedoch das GNE3-spezifische Startcodon. GNE3 scheint also evolutionär später entstanden zu sein. Nach der Trennung der Nagervorläufer vom Primatenvorläufer kam es bei letzterem zu einer spontanen Mutation im Exon A1, welche zu dem alternativen Startcodon und damit zu dem GNE3-Protein führte. Beim Schwein, welches dem Menschen genomisch am ähnlichsten ist, konnte GNE3 ebenfalls nicht entdeckt werden. Da aber für diese und andere Spezies das Genom noch nicht vollständig

Diskussion

durchsequenziert ist, kann die Existenz weiterer Isoformen nicht ausgeschlossen werden.

Die PCR-Analysen verschiedener humaner und muriner Gewebe sollten Aufschluß über die Verteilung der einzelnen Isoformen geben. Sowohl hGNE1 als auch mGNE1 konnten wie erwartet in jedem Gewebe nachgewiesen werden und bestätigen damit frühere Northern-Blot-Analysen. Zudem war es, auch in Hinsicht auf den Pathomechanismus der h-IBM, interessant zu sehen, wie es sich mit der Verteilung der neuen GNE-Isoformen verhält. Zum einen konnte GNE2 in sieben, GNE3 in vier von zehn humanen Geweben, zum anderen konnte GNE2 in vier von fünf murinen Geweben nachgewiesen werden. Die spezifische Verteilung der Isoformen stimmte zwischen den Organismen fast überein. Es konnte allerdings keine der neuen Isoformen im humanen, aber jedoch im murinen Skelettmuskel nachgewiesen werden. GNE2 fand sich dafür in humaner, aber nicht in der murinen Leber.

Diese Ergebnisse geben nur bedingt Aufschluß über den Einfluß der Isoformen auf den Pathomechanismus der h-IBM. Für die RT-PCR-Analysen wurde normales, gesundes Gewebe vom Skelettmuskel eingesetzt. Geht man aber davon aus, daß das Krankheitsbild durch eine Hyposialylierung ausgelöst wird, könnten die Isoformen mit ihrer reduzierten Epimeraseaktivität trotzdem dafür verantwortlich sein. So könnte die Expression der einzelnen Isoformen auf der Ebene des Transkriptoms reguliert werden. Durch eine Fehlregulation verschiebt sich im pathogenen Gewebe die Expression von GNE1 nach GNE2 bzw. GNE3. Aufklärung hierüber würden PCR- und Northern-Blot-Analysen von Patientenmaterial liefern. Im Skelettmuskel müßten dann Banden für GNE2 oder GNE3 zu detektieren sein.

4.2. Klonierung, Expression und Reinigung der humanen und murinen GNE-Isoformen

Die neuen humanen und murinen GNE-Isoformen wurden kloniert, in *Sf900*- und *E.coli* BL21-Zellen funktionell exprimiert und auf Proteinebene charakterisiert. Sowohl die humanen Isoformen GNE1 und GNE2, als auch die murinen Isoformen konnten dabei in ausreichenden Mengen (2-4 mg) hergestellt werden. Durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie ließen sich die Proteine mit einem Reinheitsgrad von über 95% aufreinigen. In der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigten hGNE1, hGNE2 und mGNE1 eine distinkte Bande. Im Gegensatz dazu wurden für mGNE2 sowohl in der SDS-PAGE, als auch im α -His-Western-Blot

zwei Banden von 70 und 75 kDa detektiert, wobei die kleinere Bande genau der Größe von GNE1 entsprach. Hierbei könnte es sich um Mischklone, das heißt um eine Kontamination mit Fremdvirus oder um eine unvollständig verlaufende Integration der cDNA in das Virusgenom handeln. Beides hat zur Folge, daß ein gewisser Anteil von funktionsfähigem Virus mGNE1 exprimiert. Die Viren wurden daher durch einen Plaque-Assay kloniert, so daß diese Punkte ausgeschlossen werden konnten. Um die Identität der kleineren Bande zu klären, wurde ein Peptide-Mass-Fingerprint durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, daß die untere Bande ebenfalls mGNE entspricht. Das läßt den Schluß zu, daß es sich um ein proteolytisches Abbauprodukt des eigentlichen Proteins handelt. Die Proteolyse müßte dann N-terminal erfolgen, da die kleinere Bande immer noch den 6xHis-Tag enthält, wie im Western-Blot gezeigt werden konnte. Die folgenden Expressionen wurden daher in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren Trasylol und MG132 durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, daß mit zunehmender MG132-Konzentration mGNE2 nicht mehr proteolytisch abgebaut wurde, aber die Expressionsrate drastisch sank. Ein weiterer Ansatz war, daß es sich um verschiedene Phosphorylierungszustände der mGNE2 handelt. Daher wurden die Proteinproben mit alkalischer Phosphatase behandelt. Auch das führte zu keinem Erfolg. Eine weitere Annahme wäre, daß mGNE2 in unterschiedlichen Glykoformen vorliegt, in diesem speziellen Fall die O-GlcNAcylierung. Cytosolische Proteine haben als häufigsten Glycosylierungstyp mit Serin oder Threonin β -verknüpftes O-GlcNAc. Dazu könnte ein Western-Blot mit einem spezifischen O-GlcNAc-Antikörper durchgeführt werden. Allerdings spricht gegen differenzielle O-GlcNAcylierung, der Unterschied der molekularen Masse von 5 kDa. Die Ubiquitinylierung als posttranslationale Modifikation wäre eine weitere Möglichkeit. Bei Proteinen, die zum Abbau bestimmt sind, wird das C-terminale Glycin des Proteins Ubiquitin (~6 kDa) kovalent mit der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten verbunden. Sogenannte PEST-Sequenzen wirken bei cytosolischen Proteinen destabilisierend, was eine schnelle Ubiquitinylierung zur Folge hat. Eine Western-Blot-Analyse mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis von aufgereinigter, rekombinant exprimierter mGNE2 mit einem α -Ubiquitin-Antikörper zeigte jedoch ebenfalls eine Doppelbande (Daten nicht gezeigt). In der Aminosäuresequenz von mGNE2 gibt es ein zweites, alternatives Startcodon, welches dem Startcodon von mGNE1 entspricht. Das alternative Startcodon wurde mutiert (M32A). Die darauffolgende Expression der Mutante in *Sf900*-Zellen

Diskussion

resultierte ebenfalls in einer Doppelbande. Daraus kann man schlußfolgern, daß das alternative Startcodon nicht benutzt und nicht die Ursache für das kleinere Protein ist. hGNE3 konnte nur in sehr geringen Mengen in Insektenzellen funktionell exprimiert werden. Ein Grund dafür ist, daß der größte Teil des exprimierten Proteins sich in der unlöslichen Fraktion befindet. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Blume *et al.* (2004a) gemacht. In dieser Arbeit wurden N-terminale Deletionsmutanten der GNE hergestellt und in Insektenzellen exprimiert. Bereits die Deletion der ersten 39 Aminosäuren führte zu drastisch verminderten Expressionsraten, die wahrscheinlich auf die Bildung unlöslichen Proteins zurückzuführen waren. Bei GNE3 fehlen die ersten 59 Aminosäuren, und offensichtlich können die neu eingeführten 14 Aminosäuren diese Strukturveränderung nicht kompensieren. Blume *et al.* (2004a) beobachteten jedoch eine geringe Menge an löslichem Protein. Dies war bei hGNE3 nicht der Fall. Ein Grund dafür könnte der geringe Titer an funktionsfähigem Virus des Erststock sein. Deshalb wurde die GNE3-cDNA umklont und als GST-Fusionsprotein in *E.coli* BL21-Zellen funktionell exprimiert. GNE3 konnte für die GST-Affinitätschromatographie in ausreichenden Mengen exprimiert werden. In weiteren Experimenten konnte sowohl die Epimerase- als auch die Kinaseaktivität für dieses Enzym bestimmt werden. Allerdings machten folgende SDS-PAGE-Analysen deutlich, daß 95% des exprimierten Proteins sich in der unlöslichen Fraktion befanden.

4.3. Charakterisierung der humanen und murinen GNE-Isoformen

Die humanen und murinen GNE-Isoformen sollten hinsichtlich ihrer Epimerase- und Kinaseaktivität analysiert werden. Für die in dieser Arbeit exprimierte hGNE1 konnte sowohl eine spezifische Epimerase- sowie Kinaseaktivität bestimmt werden, die mit Werten aus früheren Publikationen (Hinderlich *et al.*, 2004) gut übereinstimmen. In der erwähnten Arbeit wurde GNE1 mit einem N-terminalen 6xHis-Tag exprimiert, während hier das Protein einen C-terminalen 6xHis-Tag enthielt. Das läßt den Schluß zu, daß der 6xHis-Tag keinen großen Einfluß auf die Aktivitäten des Enzyms hat. Analog dazu konnten für mGNE1 ähnliche Aktivitäten bestimmt werden. Für hGNE2 konnte eine deutliche verminderte Epimeraseaktivität gezeigt werden. Es hat den Anschein, daß die zusätzlichen Aminosäuren die Struktur des N-Terminus derartig beeinflussen, daß es zu einer Verringerung der Epimeraseaktivität kommt. Dem widerspricht, daß das Mausomolog von GNE2, trotz zusätzlichem Exon A1 die gleiche Epimeraseaktivität besitzt wie hGNE1 und mGNE1. Dies ist neben der

unterschiedlichen Gewebsverteilung ein weiterer Unterschied zwischen hGNE2 und mGNE2.

Die transiente Proteinexpression der humanen und murinen GNE-Isoformen in *CHO*-Zellen und die anschließende Bestimmung der Epimeraseaktivität mittels radiometrischen Assays bestätigte im wesentlichen die Ergebnisse der in Insektenzellen rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteine. Human und murin GNE1 haben die gleiche Epimeraseaktivität. Wohingegen hGNE2 eine stark reduzierte Epimeraseaktivität aufweist, zeigt mGNE2 eine um den Faktor zwei erhöhte Epimeraseaktivität. Die Lysate der aufgearbeiteten Zellen zeigten in den Western-Blot-Analysen mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis keine eindeutigen Banden für die rekombinanten GNE-Isoformen. Es konnte nur eine schwache Bande der endogenen, nicht aktiven GNE der *CHO*-Zellen detektiert werden. Die schwache Expression der Isoformen scheint aber ausreichend für den radiometrischen Epimeraseassay zu sein.

Sowohl für die in Insektenzellen als auch für die in Säugerzellen transient exprimierte hGNE3 konnte keine Epimeraseaktivität nachgewiesen werden, was die oben genannte Annahme, daß die neu eingeführten 14 Aminosäuren die Strukturveränderung durch das Fehlen der ersten 59 Aminosäuren nicht kompensieren können, bestätigt. Das komplette Fehlen der durch das Exons 2 codierten Aminosäuren scheint die Ursache für den Verlust der Epimeraseaktivität zu sein. Dieses Ergebnis stimmt wiederum mit Beobachtungen von Blume *et al.* (2004a) überein. Bereits die Deletion der ersten 39 Aminosäuren führte zu einem kompletten Verlust der Epimeraseaktivität, jedoch konnte für diese Mutante auch Kinaseaktivität gefunden werden. Die spezifischen Kinaseaktivitäten von hGNE2, hGNE3, mGNE1 und mGNE2 liegen alle in derselben Größenordnung. Die strukturellen Veränderungen am N-Terminus haben auf die C-terminal gelegene Kinasedomäne keinen Einfluß, wie es etwa bei den schon bereits erwähnten Deletionsmutanten der Fall ist. Da für hGNE2, mGNE2 und hGNE3 aktives Protein exprimiert werden konnte, sind die im ersten Teil der Arbeit bestimmten cDNA- und Proteinsequenzen korrekt.

Welchen Einfluß die verschiedenen N-Termini der humanen und murinen GNE-Isoformen auf die Bildung oligomerer Strukturen haben, sollte durch Gelfiltrationsanalysen bestimmt werden. Hinderlich *et al.* (1997) zeigten für GNE1 der Rattenleber, daß das Enzym *in vitro* sowohl ein Hexamer als auch ein Dimer bilden

Diskussion

kann, wobei das Hexamer den natürlichen Zustand in der Zelle darstellt. Das Hexamer besitzt beide Enzymaktivitäten, das Dimer lediglich ManNAc-Kinaseaktivität. Ghaderi *et al.* (2007) konnten mit biophysikalischen Methoden wie Analytische Ultrazentrifugation und Dynamische Lichtstreuung zeigen, daß hGNE1, nicht wie ursprünglich angenommen als Hexamer und Dimer, sondern als Tetramer und Dimer existiert, wobei das Tetramer beide Enzymaktivitäten und das Dimer nur die Kinaseaktivität aufweist. Die Gelfiltrationsanalysen der, in dieser Arbeit in Insektenzellen, rekombinant exprimierten hGNE1 zeigten, daß das Enzym ebenfalls als Tetramer und Dimer vorliegt und die Arbeiten von Ghaderi *et al.* (2007) bestätigt. Für mGNE1 offenbarten die Gelfiltrationen ebenfalls die Existenz eines Tetramers und Dimers. Für hGNE2 zeigten die Analysen das alleinige Vorkommen eines dimeren Zustandes. Dies legt die Vermutung nahe, daß die zusätzlichen Aminosäuren einen negativen Einfluß auf die Struktur haben und somit nur Dimere gebildet werden können. Diese Schlußfolgerung sollte man dann auch für das Maushomolog GNE2 annehmen können. Die Gelfiltrationsanalysen zeigen aber für mGNE2 das hauptsächliche Vorkommen eines Tetramers und nur zu geringen Anteilen eines Dimers. Es besteht die Möglichkeit, daß die Bildung des Tetramers durch die zusätzliche Expression des 70 kDa-Proteins, welches mGNE1 entsprechen könnte, bewirkt werden könnte. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da SDS-PAGE-Analysen von Fraktionen nach der Gelfiltration, die nur Dimer enthalten, das gleich Verhältnis von 75 kDa- zu 70 kDa-Bande aufweisen wie die Fraktionen mit tetramerem Protein. Somit unterscheiden sich hGNE2 und mGNE2 auch in der oligomeren Struktur.

Die unterschiedlichen Quartärstrukturen der einzelnen Proteine erklären auch die unterschiedlichen Epimeraseaktivitäten. Sowohl hGNE1 und mGNE1 als auch mGNE2 sind in der Lage epimeraseaktive Tetramere zu bilden, wohingegen hGNE2, welches als Dimer vorliegt, kaum Epimeraseaktivität besitzt. Offensichtlich scheinen nur die Tetramere Epimeraseaktivität zu besitzen, wohingegen die Dimere nur ManNAc-Kinaseaktivität haben. Diese Ergebnisse stimmen prinzipiell mit den früheren Ergebnissen für die Ratten-GNE (Hinderlich *et al.*, 1997) überein, mit der Ausnahme, daß die Epimeraseaktivität Hexameren zugeordnet werden konnte. Allerdings stellten Hinderlich *et al.* (1997) ebenso fest, daß mit der Dimerbildung ein völliger Verlust der Epimeraseaktivität einhergeht, was nicht erklären würde, warum hGNE2 als Dimer Epimeraseaktivität besitzt. Zum einen könnte der modifizierte

N-Terminus den völligen Verlust der Epimeraseaktivität verhindern. Eine weitere Vermutung wäre, daß bei Anwesenheit des Substrates UDP-GlcNAc hGNE2 sich vom Dimer zum Tetramer zurückbildet und somit eine geringe Epimeraseaktivität zu messen ist. Diese Tatsache konnten Hinderlich *et al.* (1999) schon für hGNE1 nachweisen. Ebenso konnte dies in dieser Arbeit für hGNE2 nachgewiesen werden. Für die nach einer Gelfiltration erhaltene Dimerpopulation wurde durch Zusatz von UDP-GlcNAc eine Epimeraseaktivität nachgewiesen. Für hGNE3 konnte keine Quartärstruktur bestimmt werden, was somit keine Schlußfolgerung zwischen Struktur und Verlust der Epimeraseaktivität zuläßt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Annahme, daß zum einen sowohl hGNE1 als auch mGNE1 für die Grundversorgung der Zelle mit Sialinsäuren zuständig sind. Da die Epimeraseaktivität von hGNE2 stark reduziert ist, scheint hGNE2 eine Auffüllfunktion zu haben. Benötigt die Zelle eine erhöhte Sialinsäuremenge, könnte GNE2 zur Neu5Ac-Produktion beitragen und somit den Sialinsäure-Pool auffüllen. Sialinsäuren können ebenso über den lysosomalen Proteinabbauweg gewonnen werden. Über die wiedergewonnenen Kohlenhydratketten, die zuvor hydrolysiert wurden, kann der ManNAc-Pool innerhalb der Zelle aufgefüllt werden. Während GNE1 durch CMP-Neu5Ac feedback inhibiert wird, können GNE2 und GNE3 das erhöhte ManNAc-Angebot phosphorylieren. Durch Erhöhung der Ausgangssubstrate wird das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben und damit die Neu5Ac-Produktion initiiert. Eventuell haben GNE2 und GNE3 nicht nur Auffüllfunktionen. Sie könnten zum einen bei der Sialinsäurebiosynthese konstitutiv aktiv und für das „Fine-Tuning“ zuständig sein. Wiederum sind die Kinasedomänen dieser beiden bifunktionellen Enzyme voll aktiv und können ersatzweise die Aufgabe anderer Zuckerkinasen ausüben, so z. B. die Phosphorylierung von GlcNAc analog der GlcNAc-Kinase (Benie *et al.*, 2004).

Auf Proteinebene sind human und murin GNE1 zu über 98% homolog, human und murin GNE2 sind zu über 96% homolog. Der zusätzliche N-Terminus von GNE2 ist nur zu 58% homolog (Tabelle 1). Aufgrund der hohen Homologie sollte man also annehmen, daß human und murin GNE2, analog zu GNE1, sich in ihren biochemischen Eigenschaften gleichen. Im Laufe der Arbeit kristallisierte sich aber immer mehr heraus, daß grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Proteinen existieren. Die PCR-Analyse verschiedener humaner und muriner Gewebe zeigte eine unterschiedliche Gewebsverteilung von GNE2. Die rekombinant exprimierten

Diskussion

Proteine zeigten Unterschiede in der spezifischen Epimeraseaktivität und den oligomeren Zuständen. Die transiente Proteinexpression in GNE-defizienten Säugerzellen bestätigten die zuvor erhaltenen Ergebnisse. Das läßt den Schluß zu, daß hGNE2 und mGNE2 unterschiedliche Funktionen in der Zelle des jeweiligen Organismus ausüben könnten.

mGNE2 besitzt die volle Epimeraseaktivität und zeigt, im Gegensatz zu hGNE2, ein anderes Strukturverhalten. Die Ergebnisse zeigen, daß der zusätzliche N-Terminus einen starken Einfluß auf die Quartärstruktur und somit die Aktivität des Proteins hat. Man kann also annehmen, daß die Aufgabe von mGNE2 über Auffüllreaktionen oder „Fine-Tuning“ darüber hinausgehen. Die meisten Sequenzabweichungen zwischen hGNE2 und mGNE2 kommen im N-Terminus der Epimerasedomäne vor. Weidemann *et al.* (2006) konnten mit Yeast-Two-Hybrid-Experimenten zeigen, daß die Dimerisierung der GNE über die Kinasedomäne verläuft. Durch Strukturaufklärungen der GNE mittels biophysikalischer Methoden wie analytische Ultrazentrifugation oder dynamische Lichtstreuung (Ghaderi *et al.*, 2007) implizierten die Ergebnisse, daß die Tetramerisierung der hGNE1 über die Epimerasedomäne erfolgt, was auch für mGNE2 der Fall sein kann. Ob die Tetramerisierung wirklich über die Epimerasedomäne erfolgt, darüber gibt letztendlich nur die Kristallisation und die Strukturanalyse der Proteine Aufklärung.

Wie bereits erwähnt, hat sich während der Evolution das hGNE3-Protein nach der Trennung der Nagervorläufer vom Primatenvorläufer durch Mutationen entwickelt. Der gleiche Verdacht liegt auch bei GNE2 nahe. Das humane Äquivalent scheint sich in der Evolution unabhängig vom Mausäquivalent entwickelt zu haben. Die Mutationen im humanen N-Terminus führten zum einen zum alternativen Startcodon für das GNE3-Protein. Zum anderen führte eine Vielzahl von weiteren Mutationen zu einer derartigen Veränderung des humanen GNE2-Proteins, daß seine Tetramerisierung gestört ist und somit die Epimeraseaktivität reduziert ist. Das GNE2-Protein steht dann der Sialinsäurebiosynthese nichtmehr vollständig zur Verfügung. Daraus ergibt sich dann die Funktion des Auffüllens oder des „Fine-Tunings“. Andererseits könnte hGNE2 für Funktionen außerhalb der Sialinsäurebiosynthese zur Verfügung stehen.

Läßt man die Annahme zu, daß hGNE2 und mGNE2 sich unabhängig voneinander entwickelt haben, kann man auch davon ausgehen, daß die beiden Proteine sich auch in ihrer Funktion neben der Sialinsäurebiosynthese unabhängig voneinander

entwickelt haben. Es gibt nur sehr wenige Beispiele, die diese Annahme bekräftigen könnten. Thematisch abweichend, aber ein gutes mögliches Beispiel wären die Proteine der Photolyase/Cryptochrom-Familie (Christmann *et al.*, 2003). DNA-Photolyasen sind monomere Proteine mit einer Größe von 55 - 70 kDa und wurden in Bakterien, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* und einigen Pflanzen, sowie beim Menschen gefunden. Außer beim Menschen ist die Aufgabe dieser Photolyasen, die UV-induzierte Reparatur von DNA-Schäden, wie die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidindimeren. Beim Menschen sind sie nicht mehr an der DNA-Reparatur beteiligt, sondern im circadianen Rhythmus involviert. Dort spricht man auch nicht mehr von Photolyasen, sondern von Cryptochromen. Der circadiane Rhythmus ist bei den Säugetieren der endogene Rhythmus, der sich auf eine Periodenlänge von 24 Stunden eingestellt hat und den Schlaf-Wach-Zyklus über die Herzfrequenz, den Bluthochdruck, die Körpertemperatur und die Hormonsekretion reguliert. Das im Menschen vorkommende Cryptochrom 1 besitzt auf Proteinebene eine Homologie von ungefähr 86% zur Photolyase des *Xenopus laevis*, von ungefähr 46% zur Photolyase von *Drosophila melanogaster* und von nur noch ungefähr 25% zur Photolyase von *Escherichia coli*.

Wie oben beschrieben macht der N-Terminus den größten Unterschied zwischen den Homologen aus und scheint verantwortlich für die biochemischen Unterschiede zu sein. Die darausfolgende Konsequenz war den N-Terminus von hGNE2 mit dem von mGNE2 auszutauschen. Das daraus entstehende Hybridprotein sollte dann auf die Epimeraseaktivität und den oligomeren Zustand hin untersucht werden. Da der murine N-Terminus eine Tetramerbildung und damit eine Epimeraseaktivität zur Folge hat, sollte die Expression des Hybridproteins zu demselben Ergebnis führen. Die transiente Proteinexpression brachte nicht den erwarteten Erfolg. Für das Hybridprotein konnte keine Epimeraseaktivität nachgewiesen werden.

4.4. Protein-Protein-Interaktionen

Ziel der Arbeit war es gewesen, zu zeigen, daß die GNE-Isoformen neben der Sialinsäurebiosynthese weitere Funktionen in der Zelle ausüben. Eine Annahme ist, daß die GNE-Isoformen unterschiedliche Interaktionspartner besitzen, was von Weidemann *et al.* (2006) schon gezeigt wurde, und somit in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind. Ein Interaktionspartner der GNE ist das PLZF. PLZF ist ein Transkriptionsfaktor dessen Aktivität durch die Bindung der GNE beeinflusst werden könnte. Die GNE könnte somit an der Regulation der Genexpression, eventuell auch

Diskussion

an der eigenen, beteiligt sein. Mutationen im GNE-Gen führen dazu, daß die Interaktionen gestört sind und es zu Fehlregulationen innerhalb der Zelle kommt und das den Pathomechanismus der h-IBM auslöst. Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die GNE VCP und Oxr1 als Interaktionspartner hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, daß weder VCP noch Oxr1 Interaktionspartner der GNE sind. Sowohl die *Pull-down*-Versuche als auch die Co-Transfektionen und Co-Immunpräzipitationen zeigen, daß unter diesen experimentellen Bedingungen keine Interaktionen stattfinden. Das VCP-Protein, welches bei der h-IBM phänotypisch ähnlichen Erkrankung IBMPFD ebenfalls mutiert ist, scheint nicht mit der GNE zu interagieren. Da aber der Krankheitsverlauf zwischen den beiden Myopathieförmern ähnlich ist, könnte man mutmaßen, daß VCP und GNE gleiche Interaktionspartner haben und ihre jeweiligen Defekte die Interaktionen stören und eine Fehlregulation auslösen.

In Yeast-Two-Hybrid-Screens wurde gezeigt, daß Oxr1 mit der GNE interagiert. Das Oxr1-Protein ist um die Kernperipherie herum lokalisiert, kann aber auch mit den Mitochondrien assoziiert sein. Studien zur Lokalisation der GNE deuten darauf hin, daß die GNE sich ebenfalls am bzw. im Kern befinden kann (Krause *et al.*, 2005). Co-Immunfluoreszenzen zeigen, daß die GNE mit Kern- und Golgimarkern colokalisiert ist. Die durchgeführten *Pull-down*-Experimente lassen aber eher den Schluß zu, daß zwischen diesen beiden Proteinen keine Interaktion stattfindet. Das Yeast-Two-Hybrid-System ist eine gute, aber nicht ganz fehlerfreie Methode, um interagierende Proteine zu identifizieren. Es ist ein auf Hefe basierendes System, die gefundenen Interaktionspartner entsprechen nicht immer den physiologischen relevanten Partnern. Zudem liefern viele Proteine, wie ribosomale und mitochondriale Proteine, Ferritin und Ubiquitin falsch positive Ergebnisse. Umgekehrt ist vom Yeast-Two-Hybrid-System bekannt, daß bereits bekannte Interaktionspartner mittels Yeast-Two-Hybrid nicht zu identifizieren waren.

Die in mehreren Arbeitsgruppen durchgeführten Experimente zu Studien der Protein-Protein-Interaktionen der GNE implizieren immer mehr, daß zusätzliche Funktionen der GNE existieren. Wann die jeweilige GNE-Isoform ihre Funktion ausführt, wird auf der Ebene der Transkriptome über das alternative Spleißen und die daraus resultierende unterschiedliche Expression der GNE-Proteine reguliert. Unter alternatives Spleißen versteht man ein Prozeß eukaryontischer Zellen, bei dem ein Vorläufer-mRNA-Transkript auf verschiedene Weise gespleißt und dadurch

unterschiedliche Polypeptidketten bzw. Proteine exprimiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist das alternative Spleißen des α -Tropomyosin-Gens (Abb. 54). Durch mehrere Arten des Spleißens entstehen verschiedene mRNAs, die in unterschiedliche Proteine translatiert werden. Die Spleißmuster werden jedoch von der Zelle je nach ihren Bedürfnissen dahingehend gesteuert, daß die unterschiedlichen Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Abb. 54).

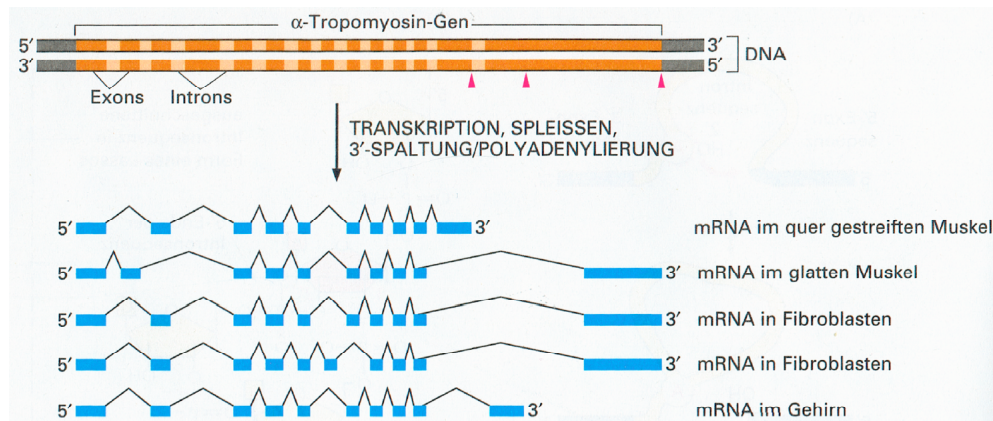


Abbildung 54: Alternatives Spleißen des α -Tropomyosin-Gens der Ratte. Das Primärtranskript kann auf mehrere Arten gespleißt werden. Die entstehenden verschiedenen mRNAs sind für bestimmte Zelltypen spezifisch (nach: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.; Molekularbiologie der Zelle; 2004; 4. Auflage).

In einigen Fällen kann das alternative Spleißen konstitutiv sein. Von den Zellen eines Organismus kann alternativ gespleißte mRNA kontinuierlich hergestellt werden. In den meisten Fällen jedoch wird das Spleißen reguliert. Das RNA-Spleißen kann sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Bei der positiven Kontrolle kann das Spleißosom ohne die Interaktion eines Aktivatorproteins eine bestimmte Intronsequenz nicht entfernen. Bei der negativen Kontrolle bindet ein Repressorprotein an eine Intronsequenz und verhindert damit, daß das Spleißosom diese Intronsequenz entfernt. Zum einen kann die Unterdrückung einer konkurrierenden Spleißstelle zu einer Aktivierung einer suboptimalen Spleißstelle führen, zum anderen kann aufgrund der Flexibilität des RNA-Spleißens die Mutation einer Spleißstelle zu einer anderen Spleißstelle führen. Beide Mechanismen resultieren in einem anderen Spleißmuster. Das Spleißen eines Vorläufer-mRNA-Moleküls kann als Gleichgewicht zwischen konkurrierenden Spleißstellen angesehen werden, welches leicht durch regulatorische Proteine gestört werden kann. Sollte die unterschiedliche Expression und die damit verbundenen verschiedenen Funktionen der GNE-Isoformen durch alternatives Spleißen reguliert werden, wäre die

Diskussion

Identifizierung dieser regulatorischen Proteine und eine eventuell damit verbundene Fehlregulation ein interessanter Ansatzpunkt zur Aufklärung des Pathomechanismus der h-IBM.