

V Zusammenfassung

Die Sialylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden auf der Zelloberfläche spielt eine essentielle Rolle bei Prozessen wie Entwicklung, Differenzierung und Entzündungsreaktionen, aber auch in der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Die Sialinsäuren, als endständige Komponenten der Oligosaccharidketten sind in eine Vielzahl von zellulären Interaktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Zellmigration und Metastasierung involviert. Sie dienen weiterhin als Erkennungsdeterminanten für Pathogene und tragen zur Stabilität von Glycoproteinen bei. Die *N*-Acetylneuraminsäure ist der biologische Vorläufer aller natürlich vorkommender Sialinsäuren. Die ersten Schritte der Sialinsäurebiosynthese, die Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu ManNAc und die anschließende Phosphorylierung in der C-6-Position werden von der UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE), dem Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, katalysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Isoformen der hGNE, hGNE2 und hGNE3, identifiziert. Im Gegensatz zu hGNE1 besitzt hGNE2 einen verlängerten, hGNE3 einen verkürzten N-Terminus. Während GNE2 auch in anderen Spezies wie Affe, Maus, Ratte, Huhn oder Fisch gefunden wurde, beschränkt sich das Vorkommen von GNE3 auf die Primaten. Sowohl die humanen als auch die murinen Isoformen zeigen gewebsspezifische Expressionsmuster. hGNE1, hGNE2, mGNE1 und mGNE2 wurden über das BAC-TO-BAC[®]-Baculovirus-System funktionell exprimiert und charakterisiert. Die His-getagten Fusionsproteine konnten als lösliche aktive Enzyme exprimiert werden und mittels Affinitätschromatographie in mg-Mengen gewonnen werden. Das hGNE3-Protein konnte in *E.coli* BL21-Zellen funktionell, aber nur in geringen Mengen exprimiert werden. Während alle rekombinanten Proteine ManNAc-Kinase-Aktivität besaßen, bildeten nur hGNE1, mGNE1 und mGNE2 UDP-GlcNAc-2-Epimerase-aktive Tetramere. Bei hGNE2 war die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität um den Faktor 5 reduziert, was auf die Bildung von Dimeren zurückzuführen war. Für hGNE3 konnte gezeigt werden, daß das Enzym keine Epimeraseaktivität mehr besaß.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die Proteine VCP und Oxr1 auf mögliche Interaktionen mit der GNE hin untersucht. Die Ergebnisse implizieren, daß sowohl VCP als auch Oxr1 keine Interaktionspartner der GNE sind.