

2 Ergebnisse

2.1 Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der Ratte (rGNE) mit und ohne Fusionsteil aus Insektenzellen

Zur Charakterisierung der Struktur und der Funktionsweise eines Proteins werden z.B. für NMR-Untersuchungen oder Kristallisations-Screenings einige Milligramm gereinigten Proteins benötigt. Bereits in Vorarbeiten zeigte die Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase im Insektenzellsystem gegenüber der Expression in Hefen (*P. pastoris*) und Bakterien (*E. coli*) mit bis zu 100 mg Protein pro Liter Kulturmedium eine 50- bis 250-fach höhere Rate (Blume *et al.*, 2004). Die Expression in Insektenzellen sollte daher mittels des BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystems (Invitrogen), mit dem das rekombinante Protein bis zu 50% des gesamten Insektenzellproteins ausmachen kann, bewerkstelligt werden. Als Wirtszellen haben sich Sf9-Zellen (aus *Spodoptera frugiperda*) bzw. High Five-Zellen (aus *Tricholusia ni*) bewährt, da sie sowohl adhärent als auch in Suspension sehr gut wachsen.

2.1.1 Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der Ratte (rGNE) ohne Fusionsteil mittels des BAC-TO-BAC-Baculovirus-Expressionssystems

Für die Expression von rGNE stand bereits ein Baculovirus zur Verfügung (Effertz, *et al.*, 1999). Mit dem Virus wurden 100 ml Sf900-Zellen für 48 h mit einer MOI von 1 inkubiert. Der cytosolische Überstand der geernteten Zellen wurde präpariert und für die nachfolgenden Versuche verwendet. Während der Reinigung des rGNE-Proteins wurden verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt, mit denen das Enzym aufgrund seiner spezifischen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von anderen cytosolischen Proteinen getrennt werden sollte. Als Indikator für den Reinheitsgrad, aber auch für die Stabilität des Proteins, diente dabei die spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität, die daher nach jedem Reinigungsschritt ermittelt wurde.

Tabelle 2.1: Säulenchromatographische Methoden zur Reinigung des rekombinanten rGNE-Proteins ohne Fusionsteil aus Insektenzellen.

	MonoQ-Chromatographie	Phenylsepharose-Chromatographie	Hydroxylapatit-Chromatographie	Nukleotid-Affinitätschromatographie^a	Salminsulfatfällung
Reinigungsfaktor^b	20	4,2	5	9	1,5
rGNE-Ausbeute in %^c	80	60	30	10-20	60
Elutionsgradient	0-600 mM NaCl	0-35% Ethylenglycol	0-60 mM Na-Phosphat	0-5 mM Nukleotide bzw. 0-1,5 M NaCl	—

^aEingesetzt wurden ATP-, ADP- und UDP-Agarosen sowie die Red- und Blue-Sepharose, die Affinität zu Nukleotid-bindenden Proteinen besitzen.

^bQuotienten aus den spezifischen Aktivitäten nach und vor der Reinigungsmethode.

^cAnteil der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität des Eluates von der Aktivität der Proteinlösung vor der Reinigung. Da nach den Nukleotid-Affinitätschromatographien keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität detektiert werden konnten, wurde die rGNE-Ausbeute nach einer SDS-PAGE anhand der rGNE-Bandenintensität quantifiziert.

Es wurden verschiedene säulenchromatographische Methoden für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Insektenzellen auf ihr Reinigungsvermögen getestet (Tabelle 2.1). So bindet das rekombinante Protein bei einem pH-Wert von 7,5 nahezu komplett an die MonoQ-Anionenaustauscher-Säule. Das gebundene rGNE-Protein wird bei einem Gradienten von 0-600 mM NaCl bei 300 mM eluiert. Der Reinigungsfaktor lag etwa bei 20. Das Protein konnte mit einer Ausbeute von 80% gewonnen werden. Nachteil der MonoQ-Säule ist die Elution mit einer hohen Salzkonzentration, die zu einem Aktivitätsverlust von etwa 7% pro Stunde führt und damit die Stabilität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf Dauer beeinträchtigt.

Die Phenylsepharosesäule trennt Proteine aufgrund hydrophober Interaktionen. Bereits beim Auftrag rGNE-haltigen Cytosols ergaben sich Ausbeuteverluste von 40%. Die Elution der übrigen 60% rGNE erfolgte mit 35% Ethylenglycol im Puffer. Der Reinigungsfaktor lag etwa bei 4,2.

Die Hydroxylapatit-Chromatographie, die nach dem Prinzip eines gemischten Ionenaustauschers arbeitet, bindet das rGNE-Protein bei einer niedrigen Pufferkonzentration (10 mM Natriumphosphatpuffer) und einem pH-Wert von 7,0 recht gut. Eluiert wird durch Erhöhung der Natriumphosphat-Konzentration auf 60 mM (pH 7,0). Der Reinigungsfaktor lag etwa bei 5. Das Protein konnte mit einer Ausbeute von 30% gewonnen werden.

Da die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase Bindungstaschen für Nukleotide bzw. Nukleotidzucker besitzt, wurden außerdem ATP-, ADP- und UDP-Agarose-Säulen sowie die Blue- und Red-Sepharose-Säule, die hohe Affinitäten zu ATP-bindenden bzw. generell Nukleotid-bindenden Proteinen aufweisen sollen, getestet. Die einzelnen Säulenmatrices unterschieden sich sowohl in der Spacerlänge zwischen Nukleotid und Matrix (9, 11 und 22 C-Atome) als auch in der Verknüpfung des Nukleotids (C-8, N-6, Hydroxyl-Gruppe der Ribose). Ausbeuteverluste von 80-90% traten trotz mehrmaligen Auftragens der Probe auf, allerdings wies das mit 5 mM ATP, ADP, UDP oder 1,5 M NaCl eluierte rGNE-Protein eine hohe Reinheit (> 90%) auf. Der Reinigungsfaktor lag in allen Fällen bei etwa 9.

Neben der Gelfiltration, die ebenfalls gute Reinigungseffekte ohne Stabilitätsprobleme des Proteins aufwies (Daten nicht gezeigt), wurde als nicht-chromatographische Methode die Salmisulfat-Fällung eingesetzt, die sich bei der Reinigung des Rattenleberenzym als effektiv erwiesen hatte (Hinderlich *et al.*, 1997). Für die Reinigung der rGNE aus Insektenzellen war die Salmisulfat-Fällung jedoch unpraktikabel. Es kam zu hohen Ausbeuteverlusten (bis zu 40%) des rekombinanten Proteins, ohne einen wesentlichen Reinigungseffekt zu erzielen (Reinigungsfaktor etwa 1,5).

Da sich durch die einzelnen Reinigungsmethoden kein homogenes rGNE-Protein gewinnen ließ, wurden die Säulen miteinander kombiniert. In Abbildung 2.1 sind die eingesetzten Säulenkombinationen zur Reinigung des rGNE-Proteins aus Insektenzellen zusammengefasst. Von ihnen erwiesen sich zwei Kombinationen von chromatographischen Methoden als geeignet, die im Folgenden detailliert beschrieben werden. Mit Hilfe der Kombination MonoQ-Säule → Gelfiltrationssäule konnten aus einer 100 ml-Insektenzellkultur etwa 0,4 mg 90% reines Protein gewonnen werden, welches bei 4°C über mehrere Tage stabil war. Um die Reinheit des Proteins weiter zu verbessern, wurde diese Kombination u.a. um eine ATP-Agarose-Säule bzw. Phenylsepharosesäule ergänzt.

Da die ATP-Agarose-Säule prinzipiell auf der Bindung von Nukleotiden basiert, musste bereits im Vorfeld der Stabilisator UDP aus dem Puffer entfernt werden. Daher wurde auch zuvor die Gelfiltration ohne UDP im Puffer durchgeführt. Dadurch gelang es, das Protein an die ATP-Agarose-Säule zu binden, allerdings wurden hohe Ausbeuteverluste gemessen. Die nachfolgende Elution ergab nahezu homogenes Protein (Abbildung 2.2), doch sinkt aufgrund der Abwesenheit des Stabilisators UDP im Puffer die Epimerase-Aktivität auf Werte nahe der Nachweisgrenze. Etwa 80 µg Protein wurden aus 100 ml Insektenkultur isoliert.

Ergebnisse

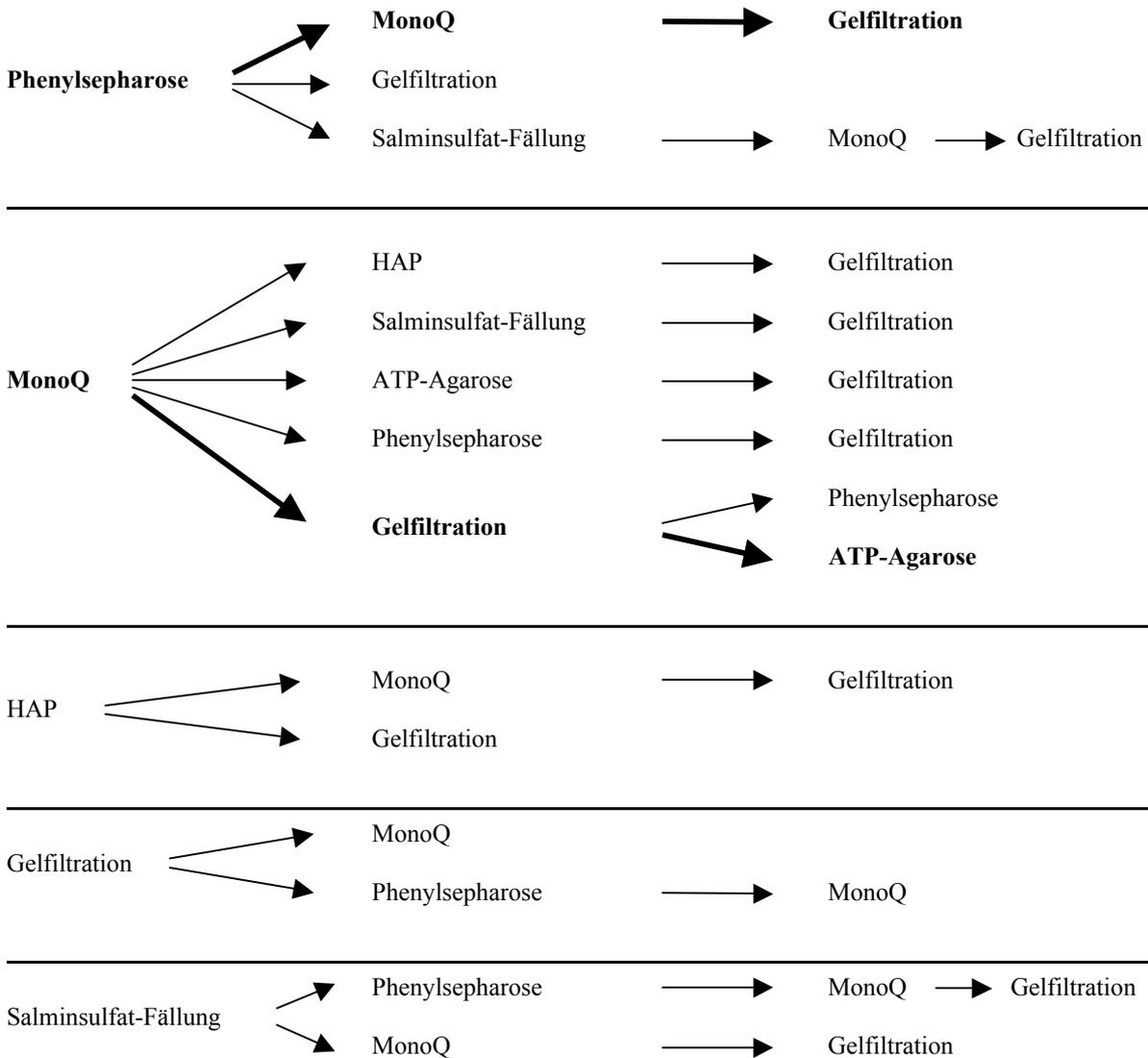


Abbildung 2.1: Kombinationen von Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit für die Reinigung der in Insektenzellen exprimierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase verwendet wurden. Die beiden effektivsten Reinigungswege sind verstärkt hervorgehoben.

Die Kombination aus Phenylsepharose-, MonoQ- und Gelfiltrationssäule ist ebenfalls zur Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase geeignet. Nach diesen drei chromatographischen Schritten konnte reine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase detektiert werden (Abbildung 2.3), die über mehrere Tage bei 4°C ihre beiden Aktivitäten stabil hält. Etwa 0,3 mg aktives Protein konnten aus 100 ml Insektenzellkultur isoliert werden.

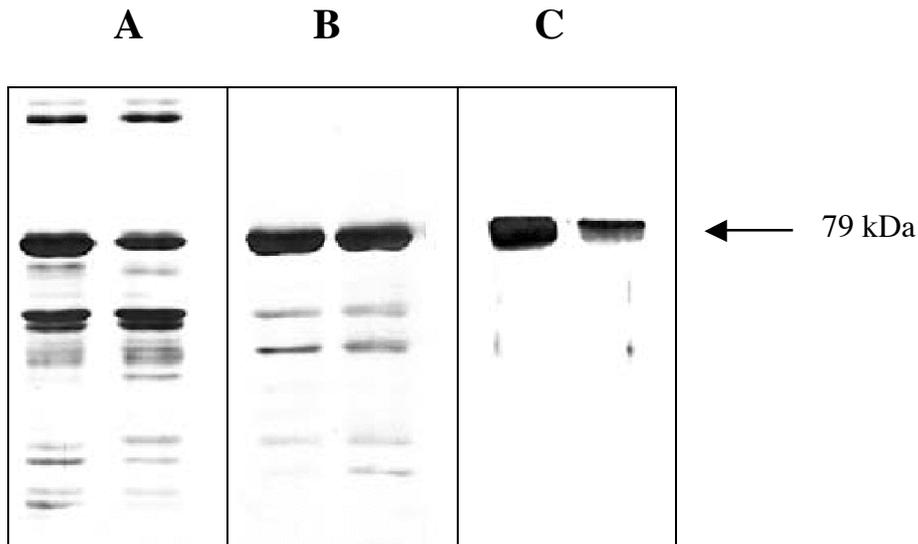


Abbildung 2.2: Reinigung der rGNE durch MonoQ-, Superdex[®]200- und ATP-Agarose-Chromatographie. rGNE wurde in Sf900-Zellen exprimiert und gereinigt (unter 6.5 beschrieben). Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE und anschließend Silberfärbung analysiert. A: Fraktionen nach der Auftrennung über die MonoQ-Säule (20 μ l); B: Fraktionen nach der Auftrennung über die Superdex[®]200-Säule (20 μ l); C: Fraktionen nach der Auftrennung über die ATP-Agarose-Säule (20 μ l). Der Pfeil kennzeichnet die Bande der 79 kDa großen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

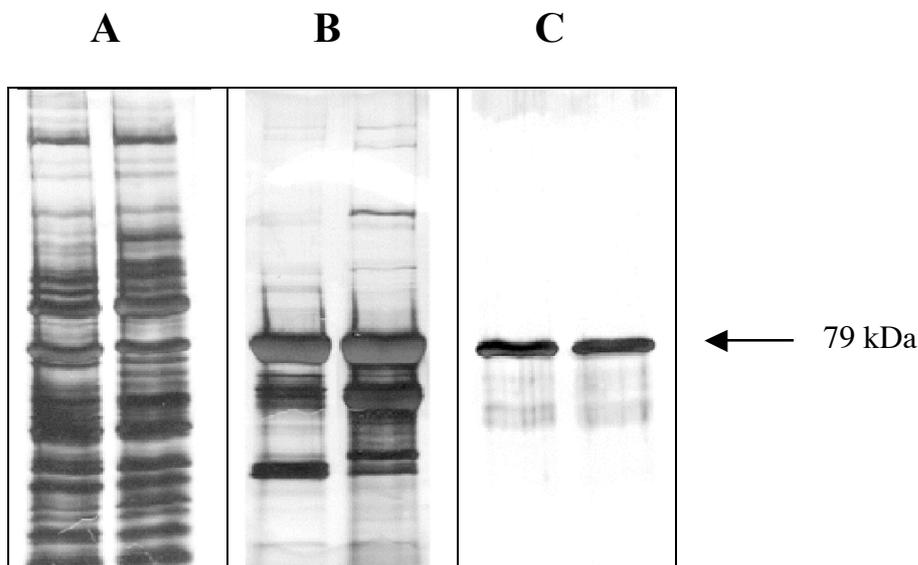


Abbildung 2.3: Reinigung der rGNE durch Phenylsepharose-, MonoQ- und Superdex[®]200-Chromatographie. rGNE wurde in Sf900-Zellen exprimiert und gereinigt (siehe 6.5). Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE und anschließend Silberfärbung analysiert. Dargestellt sind die Epimerase-aktivsten Fraktionen nach der Auftrennung über die Phenylsepharose-Säule (A; 20 μ l), MonoQ-Säule (B; 20 μ l) und Superdex[®]200-Säule (C; 20 μ l). Der Pfeil kennzeichnet die Bande der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase.

2.1.2 Expression und Reinigung der His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (His₆-rGNE) aus Insektenzellen

Für die Expression von His₆-rGNE stand ebenfalls bereits ein Baculovirus zur Verfügung (Blume, *et al.*, 2004). Mit dem Virus wurden 100 ml Sf900-Zellen für 48 h mit einer MOI von 1 inkubiert. Die geernteten Zellen wurden im Lysepuffer resuspendiert, mittels einer Spritze homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde für die nachfolgenden Versuche verwendet. Zur Reinigung des His₆-rGNE-Proteins wurde die hohe Affinität des His₆-Fusionsteils zu Ni²⁺-Ionen der Ni-NTA-Säulenmatrix genutzt. Das Fusionsprotein liegt nach Elution mit 100 mM Imidazol nahezu rein vor (über 99%; Abbildung 2.4). Dabei können aus 100 ml Insektenzellkultur bis zu 5 mg lösliche bifunktionelle His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase isoliert werden, was im Vergleich zur Reinigung ohne einen Fusionsteil um den Faktor 25 effizienter ist. Nach der Elution sinkt die Aktivität rasch ab, vermutlich wird dieser Effekt durch das Elutionsmittel Imidazol und/oder durch mitteluierte Ni²⁺-Ionen hervorgerufen. So konnten Zeitler *et al.* (1992) zeigen, dass die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch Metallionen gehemmt wird. Zur Stabilisierung der Aktivität wurde daher die Proteinlösung nach der Elution mittels einer PD10-Säule in Gelfiltrationspuffer zügig umgepuffert. Die spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität beträgt nach diesem Schritt etwa 950 mU/mg.

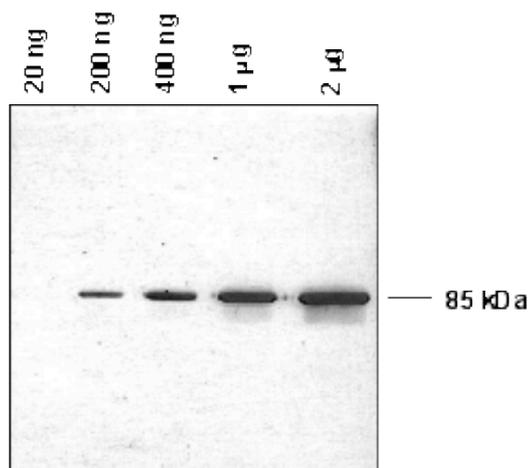


Abbildung 2.4: Gereinigtes His₆-rGNE-Protein nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie und PD10-Gelfiltration.

His₆-rGNE wurde in Sf900-Zellen exprimiert und gereinigt (in 6.7.1 beschrieben). Das gereinigte Fusionsprotein wurde mittels Silberfärbung analysiert, wobei verschiedene Mengen des 85 kDa großen His₆-rGNE-Proteins zur Überprüfung der Reinheit aufgetragen wurden.

2.1.3 Expression und Reinigung des StrepII-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Fusionsproteins (rGNE-Strep) aus Insektenzellen

Eine alternative Reinigungsmethode basiert auf den StrepII-Tag. Analog zum His₆-Fusionsteil besitzt der StrepII-Fusionsteil, ein Oktapeptid, eine hohe Affinität zu StrepTaktin, bei dem es sich um eine modifizierte Form von Streptavidin handelt. Die Elution erfolgt mittels Desthiobiotin, einem Derivat des nativen Liganden Biotin. Es wurden drei StrepII-Fusionsproteine der rGNE generiert. Zum einen wurden N- bzw. C-terminal StrepII-Fusionsteile hinzugefügt, zum anderen wurde der N-terminale StrepII-Tag noch durch einen His₆-Fusionsteil ergänzt (Abbildung 2.5).

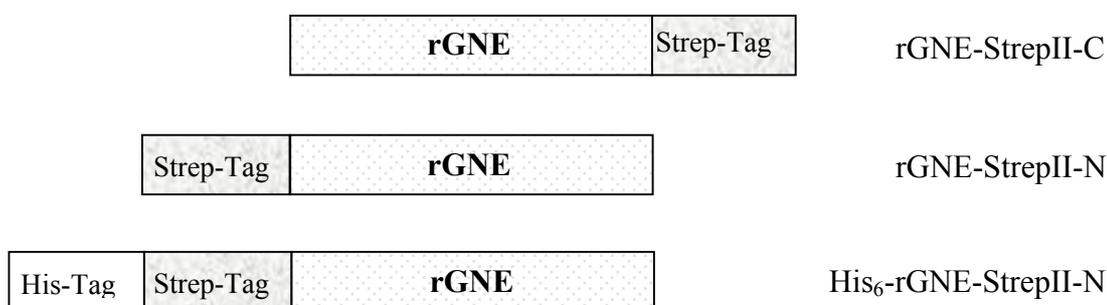


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Strep-Tag-Konstrukte.

Da für diese Konstrukte keine kommerziellen Vektoren erhältlich waren, wurden die Fusionsteile mittels PCR auf cDNA-Ebene hinzugefügt. Im ersten Schritt wurde mit flankierenden degenerierten Primern, welche sich je nach Konstrukt am 3'- bzw. am 5'-Ende befinden, das rGNE-Gen aus dem Donorplasmid pFASTBAC1-rGNE amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem pCR-Blunt-Vektor ligiert. Nach der folgenden Transformation in kompetente TOP10-Zellen wurden die Plasmide präpariert, deren DNA-Sequenz schließlich überprüft wurde. Da alle Konstrukte fehlerfrei waren, wurde aus den korrekten Plasmiden das rGNE-Strep-Fusionsgen mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *KpnI* ausgeschnitten. Die 2,2 kb-Fragmente wurden schließlich mit dem zuvor mit *XhoI* und *KpnI* geschnittenen pFASTBAC1- bzw. pFASTBACHTA-Vektor ligiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA präpariert und in kompetente *E. coli* DH10BAC-Zellen transformiert. Positive Klone, bei denen eine Transposition des modifizierten Gens vom Donorplasmid zum Bacmid stattfand, wurden durch Blau/Weiß-Selektion identifiziert und vermehrt. Die aus den positiven Klonen präparierte, rekombinante Bacmid-DNA wurde im Anschluss in Sf9-

Insektenzellen transfiziert. 5 Tage nach der Transfektion wurden in den Zellkulturüberständen die ersten rekombinanten Baculovirus-Partikel geerntet, die mittels zweier aufeinanderfolgender Infektionen von Sf9-Insektenzellen amplifiziert wurden.

Zur Expression der verschiedenen rGNE-Fusionsproteine wurden nach der Virustiterbestimmung vorwiegend konstant hoch exprimierende Sf900-, aber auch Hi5-Insektenzellen mit einer MOI von 1 infiziert und 48 h nach der Infektion geerntet. Dabei betrug der Anteil des jeweiligen rekombinanten Fusionsproteins bis zu 30% der Gesamtproteinmenge. Die erfolgreiche Expression der Fusionsproteine rGNE-Strep-C, rGNE-Strep-N und His₆-rGNE-Strep-N wurde mit Hilfe von Enzymaktivitäts-Assays und mittels SDS-PAGE-Analyse verifiziert (nicht gezeigt). Anschließend konnten alle drei Konstrukte über die StrepTaktin-Säule gereinigt werden, jedoch wiesen die Eluate neben dem gereinigten Strep-Fusionsprotein noch weitere Proteinbanden im SDS-PAGE-Gel auf (Abbildung 2.6).

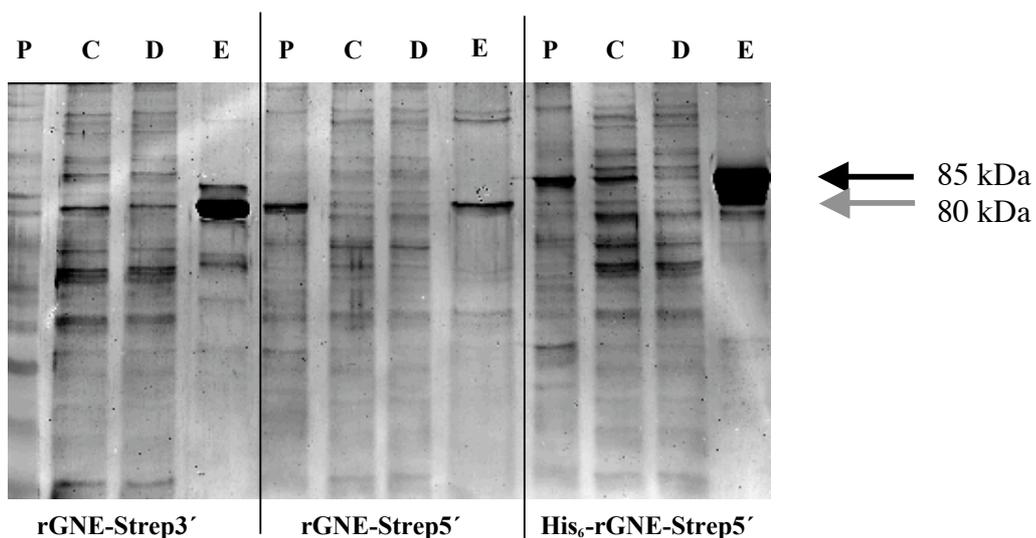


Abbildung 2.6.: Reinigung der StrepII-Fusionsproteine rGNE-StrepC, rGNE-StrepN und His₆-rGNE-StrepN. Auf ein 10%-iges SDS-Gel wurde von jedem Reinigungsschritt jeweils 500 ng Protein aufgetragen. Der graue Pfeil kennzeichnet rGNE-StrepC und rGNE-StrepN, der schwarze Pfeil kennzeichnet His₆-rGNE-StrepN (P: Pellet, C: Cytosol, D: Durchlauf, E: Eluat).

Die Effizienz der Bindung an der Säule schwankt je nach Konstrukt stark, so zeigt His₆-rGNE-Strep-N die besten Bindungseigenschaften, während die Menge und Aktivität an gebundenem und später eluiertem rGNE-Strep-N-Protein nahe der Nachweisgrenze lag. In Tabelle 2.2 sind die prozentualen Anteile der Gesamtpimeraseaktivitäten der bei den Reinigungsschritten gewonnenen Proteinlösungen zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Relative UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitäten der bei der StrepTaktin-Reinigung gewonnenen Proben.

	rGNE-Strep-C Gesamtaktivität (%)	rGNE-Strep-N Gesamtaktivität (%)	His₆-rGNE-Strep-N Gesamtaktivität (%)
Lysat	100%	100%	100%
Cytosol	97%	82%	93%
Durchlauf	58%	82%	37%
Eluat	4%	0,1%	13%

Die effizienteste Reinigung von aktiven StrepII-rGNE-Fusionsproteinen wurde mit dem His₆-rGNE-Strep-N-Konstrukt erzielt. Es konnten 13% des aktiven His₆-rGNE-Strep-N-Enzyms gereinigt werden. Benutzt man den Durchlauf einer His₆-rGNE-Strep-N-Präparation erneut als Auftrag für eine anschließende Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie, so können nochmals 17% des His₆-rGNE-Strep-N-Enzyms isoliert werden. Die Aktivitätsanteile der gereinigten rGNE-StrepC- und rGNE-Strep-N-Konstrukte an der zuvor ermittelten Gesamtaktivität lagen bei lediglich 4% bzw. 0,1%. Aus 100 ml Insektenzellkultur konnten mittels einer StrepTaktin-Säule 1,8 mg His₆-rGNE-Strep-N, 1,4 mg rGNE-Strep-C und 80 µg rGNE-Strep-N mit einer spezifischen Aktivität von 900, 260 bzw. 25 mU/mg gewonnen werden.

2.2 Charakterisierung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mittels biophysikalischer Methoden

Zur Kristallisation des rGNE-Proteins müssen wesentliche Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zunächst muss das Protein, wenn möglich, bis zur Homogenität gereinigt und löslich sein. Für ein Kristallisations-Screening werden Proteinmengen im mg-Bereich und eine Proteinkonzentration von mindestens 2 mg/ml benötigt. Des Weiteren muss das Enzym eine native Konformation aufweisen, worüber Aktivitäts-Assays Auskunft geben können. Diese Grundvoraussetzungen sind für eine Kristallisation obligatorisch. Nur das gereinigte His₆-rGNE-Protein erfüllt alle diese genannten Bedingungen. Daher beschränkt sich die nachfolgende Charakterisierung auf dieses Fusionsprotein-Konstrukt. Weiterhin müssen zum Aufbau eines Kristalls die Bausteine des Proteinkristalls einheitlich sein. Hierfür muss eine monomodale Proteinlösung vorliegen, die u. a. einen definierten oligomeren Zustand voraussetzt, was im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene biophysikalische Methoden überprüft worden ist.

2.2.1 Charakterisierung des rekombinanten His₆-rGNE-Proteins mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Zur Ermittlung der Modalität einer His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Lösung wurde zunächst die Technik der dynamischen Lichtstreuung angewandt. Hierfür wurde zuvor zur Abtrennung unlöslicher Teilchen die Proteinlösung 10 min bei 10000 × g zentrifugiert, filtriert und anschließend bei 20°C für 90 sec vermessen. Anhand des Streuverhaltens der Lösung konnten über die Stokes-Einstein-Gleichung die Stokes-Radii der Subpopulationen ermittelt werden. In Abbildung 2.7 ist ein Histogramm eines repräsentativen DLS-Experiments dargestellt.

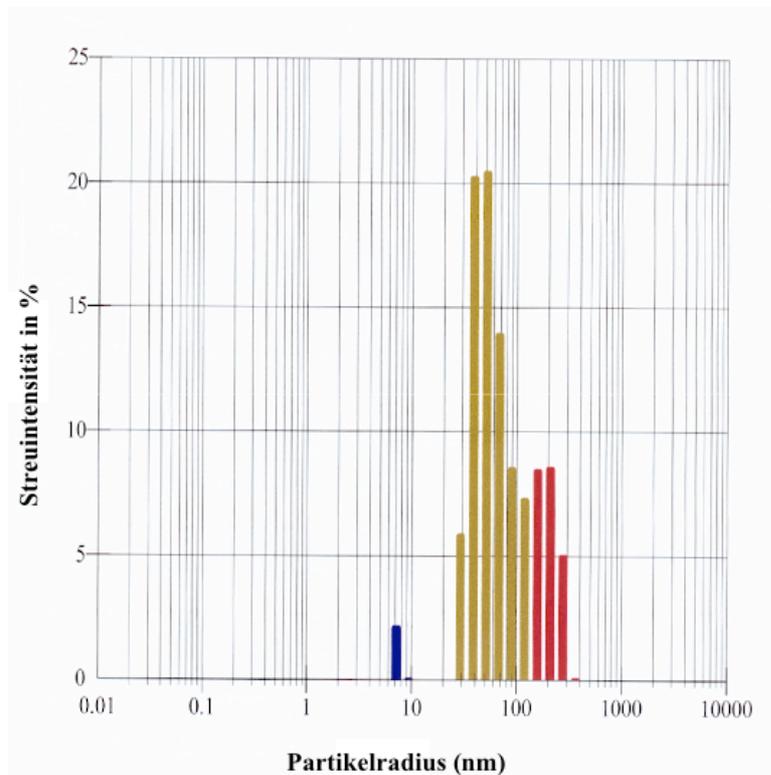


Abbildung 2.7: Histogramm eines DLS-Experiments mit dem His₆-rGNE-Protein. Die Proteinlösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml und lag in 20 mM HEPES pH 7,5 / 1 mM DTT vor. Die Messergebnisse wurden als Streuung dreier Subpopulationen mit Peaks bei 7, 60 und 205 nm interpretiert. Die Gesamtstreuung wurde gleich 100% gesetzt.

Die Proteinlösung zeigt eine trimodale Verteilung, d.h. es konnten drei verschiedene Subpopulationen identifiziert werden. Die geringste Streuintensität hat dabei die Subpopulation Nr. 1 (Abbildung 2.7, blau), deren Einzelpartikel einen Stokes-Radius von unter 10 nm besitzen und sich deutlich von den wesentlich größeren Partikeln der beiden

anderen Subpopulationen abgrenzen. Geht man davon aus, dass das rGNE-Protein ein globuläres Protein ist, so können aus den Stokes-Radii wiederum die Molekulargewichte über Referenzwerte ermittelt werden. Diese Molekulargewichte sind neben den Massenanteilen der einzelnen Subpopulationen, die sich aus der Streuintensität ergeben, in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Ergebnisse des DLS-Experiments mit gereinigter His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Abbildung 2.7.

Population	Diffusionskoeffizient [cm ² /s] × 10 ⁻⁹	Stokes-Radius [m] × 10 ⁻⁹	Poly-Dispersität [m] × 10 ⁻⁹	Molekulargewicht [kDa]	Mengenanteile in %	Signalintensität in %
Nr. 1	300,0	7,134	0,000	334	87,8	2,1
Nr. 2	41,70	59,96	25,64	48640	12,2	76,0
Nr. 3	10,96	205,4	45,12	859100	0,0512	21,9

Die Population Nr. 1 weist einen Stokes-Radius von etwa 7,1 nm auf, was bei einem globulären Protein einem Molekulargewicht von 334 kDa entspricht. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Monomers (85,4 kDa) und des ermittelten Molekulargewichts gibt den oligomeren Zustand des Proteins wieder, der bei 3,9 liegt. Mit 87,8% besitzt die Subpopulation Nr. 1 auch den größten Mengenanteil. Dies ist ein erster Anhaltspunkt, dass das rGNE-Protein vorwiegend einen tetrameren Zustand einnimmt. Bei den beiden anderen Subpopulationen handelt es sich um aggregiertes His₆-rGNE-Protein, die 97,9% der Signalintensität verursachen, obwohl sie nur einen Mengenanteil von 12,2% ausmachen. Daher eignet sich die dynamische Lichtstreuung zur Detektion auch kleinster Mengen kontaminierender Proteinaggregate, die bei der Kristallisation stören.

2.2.2 Charakterisierung des rekombinanten His₆-rGNE-Proteins mittels analytischer Ultrazentrifugation

Eine weitere Technik, die zur biophysikalischen Charakterisierung genutzt wurde, ist die der analytischen Ultrazentrifugation. Sie gibt Auskunft über die oligomeren Zustände eines Proteins sowie der Dissoziationskonstanten zweier oder mehrerer Subpopulationen eines Proteins. Es wurden sowohl die Sedimentationsgeschwindigkeits- als auch die Sedimentationsgleichgewichtsmethode angewandt.

Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment:

Zur Abtrennung unlöslicher Teilchen wurde die Proteinlösung analog zu den DLS-Experimenten bei $10000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Beim Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wurde die His₆-rGNE-Proteinlösung alleine bzw. mit 10 mM UDP-GlcNAc und/oder mit 100 μ M CMP-Neu5Ac bei $40000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde die zeitabhängige Entwicklung des Proteinkonzentrationsgradienten für 5 h in 30 sec-Intervallen erfasst. In Abbildung 2.8 ist neben den experimentellen Daten auch die daraus berechnete c(S)-Verteilung (axiale Konzentrationsverteilung der Svedberg-Größen) dargestellt.

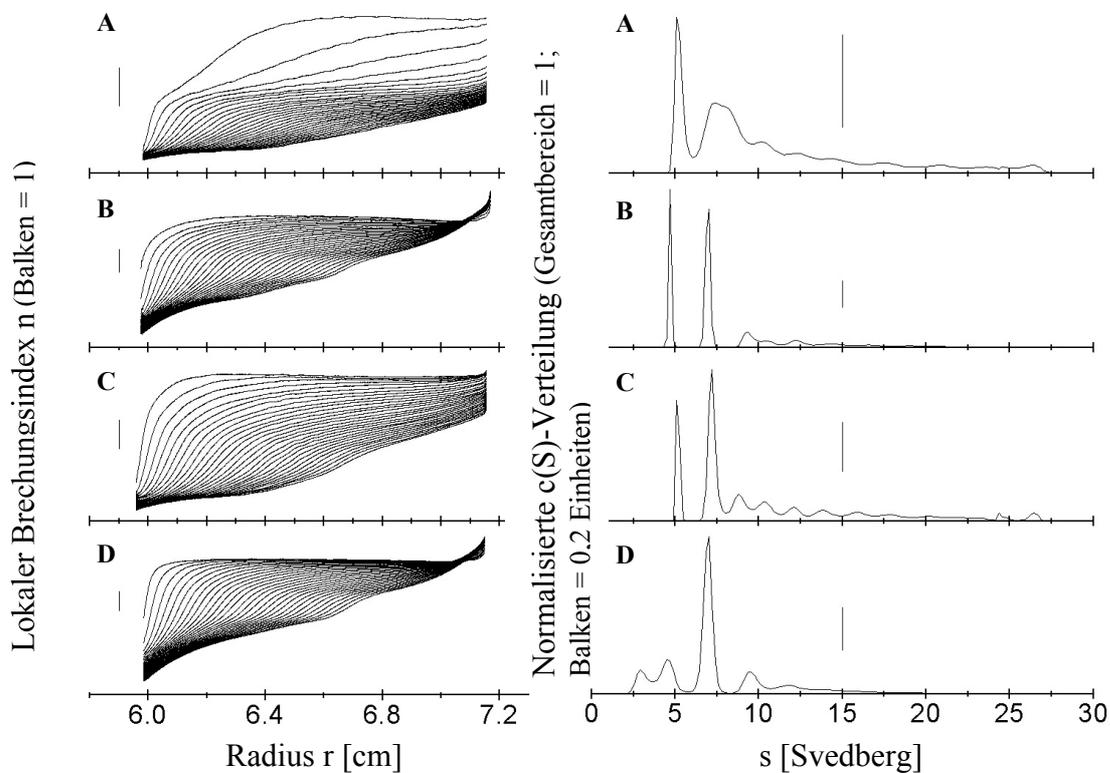


Abbildung 2.8: Sedimentationsgeschwindigkeits-Analyse des His₆-rGNE-Proteins ohne bzw. mit UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac. A: His₆-rGNE ohne Zusätze. B: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc. C: His₆-rGNE mit 0,1 mM CMP-Neu5Ac. D: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc und 0,1 mM CMP-Neu5Ac. Links sind die experimentellen Daten abgebildet. Zur besseren Veranschaulichung wird lediglich jede zehnte Erfassung der ersten 300 Messungen abgebildet. Zeit- und Radial-unabhängiges Rauschen wurde subtrahiert. Die lokalen Brechungsindices n sind gegen den Abstand zur Rotationsachse r aufgetragen. Rechts sind die berechneten c(S)-Verteilungen dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Svedberg-Werte zu einem Integral-Wert von 1 im Bereich von 1,58 – 27,86 S normalisiert. S-Werte, die kleiner als 1,58 S sind, beschreiben die Sedimentation von Pufferkomponenten, UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac und werden daher in der c(S)-Verteilung nicht abgebildet.

Das His₆-rGNE-Protein aggregiert während der Zentrifugation stark, kann jedoch in Anwesenheit des Substrats UDP-GlcNAc und/oder des Inhibitors CMP-Neu5Ac stabilisiert

werden. Das Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit dem His₆-rGNE-Protein alleine zeigt deutlich, dass es sich um eine sehr heterogene Mischung von Subpopulationen handelt. Da größere Aggregate in der Proteinlösung vor der analytischen Ultrazentrifugation entfernt wurden, müssen die beobachteten Aggregate während des Verlaufs der Zentrifugation entstanden sein. Die Aggregation des rekombinanten Proteins ist demnach ein kontinuierlicher Prozess, der während der Zentrifugation bestehen bleibt. Im Gegensatz dazu ist die Menge und Größe der Aggregate sowie die Komplexität der c(S)-Verteilung in Anwesenheit von Substrat und/oder Inhibitor deutlich reduziert. Setzt man S-Werte, die größer als 8,2 S sind, als Aggregate fest, so bilden etwa 56% der His₆-rGNE-Moleküle in Abwesenheit jeglicher Nukleotidzucker Aggregate. In Anwesenheit von CMP-Neu5Ac liegt der gemessene Aggregat-Anteil bei etwa 51%, in Anwesenheit von UDP-GlcNAc bei etwa 34%. Die höchste Reduktion des Aggregatanteils wurde in Anwesenheit beider Nukleotidzucker ermittelt, der bei etwa 27% lag. Der Reibungskoeffizient wurde bei 1,26 fixiert. Aufgrund der Komplexität der c(S)-Verteilung und der unbekanntenen Assoziations- und Dissoziations-Kinetiken des His₆-rGNE-Proteins konnten den einzelnen Maxima in der c(S)-Verteilung in diesen Experimenten allerdings keine oligomeren Zustände zugeordnet werden.

Sedimentationsgleichgewichts-Experiment:

Beim Sedimentationsgleichgewichtslauf wurde His₆-rGNE alleine bzw. mit 10 mM UDP-GlcNAc und/oder mit 100 µM CMP-Neu5Ac analysiert. Um die Sedimentation anderer Pufferbestandteile insbesondere der hinzugefügten Nukleotidzucker UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac zu überprüfen, wurde neben den Proben eine Kontrolle des Puffers mit den Nukleotidzuckern zentrifugiert. Es konnte keine Umverteilung der Nukleotidzucker unter den Versuchsbedingungen beobachtet werden. Die bei den Experimenten detektierten Signale enthalten daher nur Informationen über das sich neu verteilende His₆-rGNE-Protein, gegebenenfalls mit gebundenem UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac. Alle Proben wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt, um gleiche Startbedingungen zu gewährleisten. Die Dauer eines Sedimentationsgleichgewichts-Experiments betrug 70-85 h. Zur Überprüfung, ob freies UDP-GlcNAc nach einer solch langen Zeitspanne nicht komplett umgesetzt wurde, wurde parallel zu der analytischen Ultrazentrifugation mit dem gleichen aufgearbeiteten Protein in der gleichen Konzentration ebenfalls bei 4°C für 85 h ein colorimetrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass weniger als 80% des Substrates UDP-GlcNAc umgesetzt wurden. Ein Kontrollexperiment wies keinen Abbau des Produktes ManNAc nach 85 h bei 4°C auf.

Die gemessenen Daten der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden zunächst durch Anpassung an ein ideales Ein-Spezies-Modell analysiert. Dazu wurde σ_{fit} , welches das mittlere Molekulargewicht beschreibt (siehe dazu 6.10.2.2), mit dem berechneten Wert σ_{calc} eines His₆-rGNE-Monomers geteilt und gegen die relative Konzentration aufgetragen (Abbildung 2.9). Der Quotient $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$ beschreibt also annähernd den mittleren oligomeren Zustand des Proteins. Das für die σ_{calc} -Berechnung benötigte Molekulargewicht des His₆-rGNE-Monomers wurde aus der Aminosäuresequenz berechnet (85,353 kDa) und als Parameter in einer Modell-abhängigen Analyse fixiert.

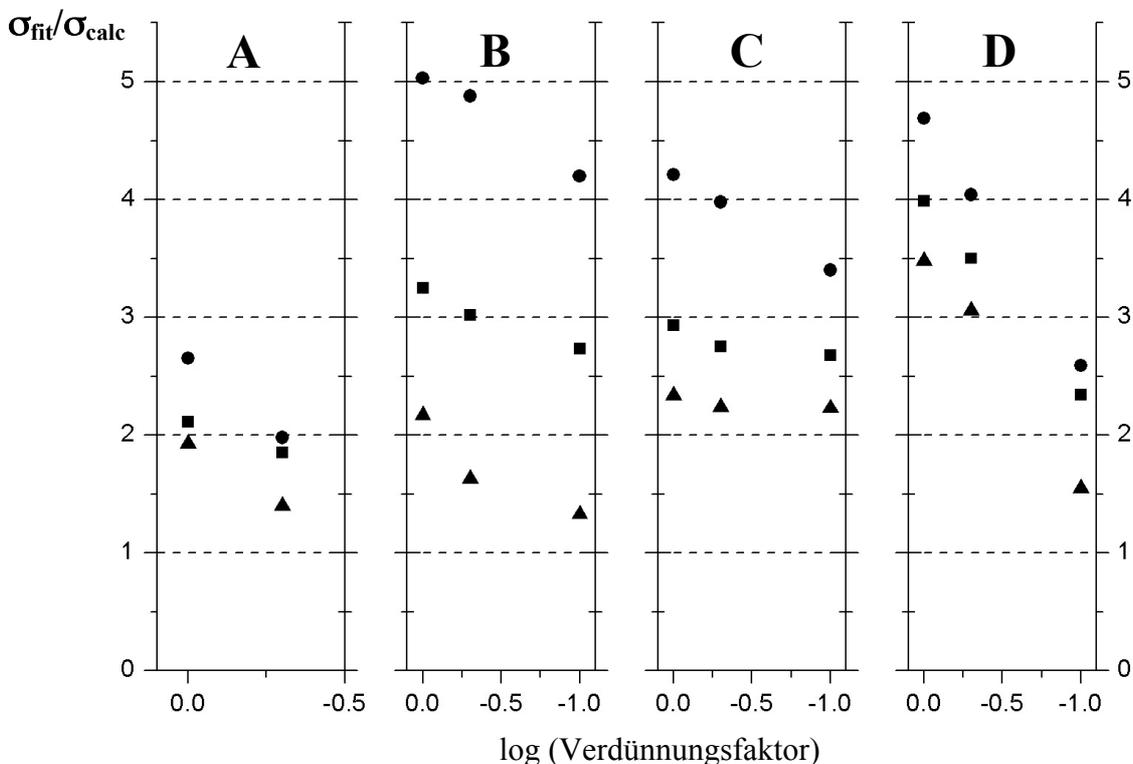


Abbildung 2.9: Sedimentationsgleichgewichts-Experimente mit His₆-rGNE-Fusionsprotein.

Ergebnisse eines initialen Ein-Spezies-Fits für die Sedimentationsgleichgewichtsläufe in Abbildung 2.10. Aufgetragen ist die relative Proteinkonzentration gegen den Quotienten $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$, welcher den mittleren oligomeren Zustand beschreibt. Die Daten wurden mit Hilfe der Interferenzoptik bei 4°C gesammelt. A: His₆-rGNE ohne Zusätze wurde in 2 verschiedenen Proteinkonzentrationen und bei 10000 (●), 15000 (■) oder 20000 rpm (▲) zentrifugiert. B-D: Die Proben wurden in 3 verschiedenen Proteinkonzentrationen und bei 6000 rpm (●), 9000 rpm (■) und 12000 rpm (▲) zentrifugiert. B: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc, C: His₆-rGNE mit 0,1 mM CMP-Neu5Ac., D: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc und 0,1 mM CMP-Neu5Ac.

Aus den Ein-Spezies-Fits konnte eine Konzentrations- und Geschwindigkeits-Abhängigkeit des gemittelten Molekulargewichtes, welches sich in dem Quotienten $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$ ausdrückt, ermittelt werden. Aufgrund des Proteinverhaltens und der zeitlich aufeinanderfolgenden Erhöhung der Rotorgeschwindigkeit (● → ■ → ▲) sinkt der Wert des Quotienten bei Konzentrationserniedrigung des Proteins bzw. Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit. Die Zugabe von Substrat und/oder Inhibitor (Abbildung 2.9, B-D) erhöhte unter allen getesteten Bedingungen den Wert des Quotienten und damit das mittlere Molekulargewicht der Gesamtpopulation. Das mittlere Molekulargewicht für das His₆-rGNE-Protein ohne zugegebene Nukleotidzucker steigt kaum über das eines Dimers. Die experimentellen Daten dieser Sedimentationsgleichgewichts-Experimente wurden mit einem Monomer-Dimer-Modell beschrieben, das mit einem zusätzlichen Term die Anwesenheit von nicht-äquilibrierenden Aggregaten berücksichtigt (siehe N_{HET} in Tabelle 2.4). Modelle, die lediglich auf einer Monomer-Trimer- oder Monomer-Tetramer-Assoziation basieren, zeigten eine höhere Varianz zu den experimentellen Daten und wurden daher verworfen. Die Annahme eines Monomer-Dimer-Modells schließt das Vorhandensein anderer höher-oligomerer Strukturen nicht aus, jedoch sind diese in Lösung für die Methode nicht stabil genug, um detailliert beschrieben werden zu können.

Basierend auf dem Konzentrations- und Geschwindigkeits-abhängigen Verhalten von $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$ wurden auch geeignete oligomere Zustandsmodelle für die Sedimentationsgleichgewichts-Experimente B bis D formuliert, die mit Hilfe der Software NONLIN mit den experimentellen Daten abgeglichen wurden. Die Varianz zwischen Modell und experimentellen Daten bestimmte die Wahl des bevorzugten Modells. Der Massenzuwachs aufgrund von gebundenem UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac wurde dabei in der Berechnung des Molekulargewichtes des Proteins vernachlässigt, da der relative Fehler in der Bestimmung des Molekulargewichtes unter 2% liegt (M_w -Quotient bei Annahme einer 1:1 Stöchiometrie: UDP-GlcNAc/GNE \cong 0,8%, CMP-Neu5Ac/GNE- \cong 0,7%, (UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac)/GNE \cong 1,5%).

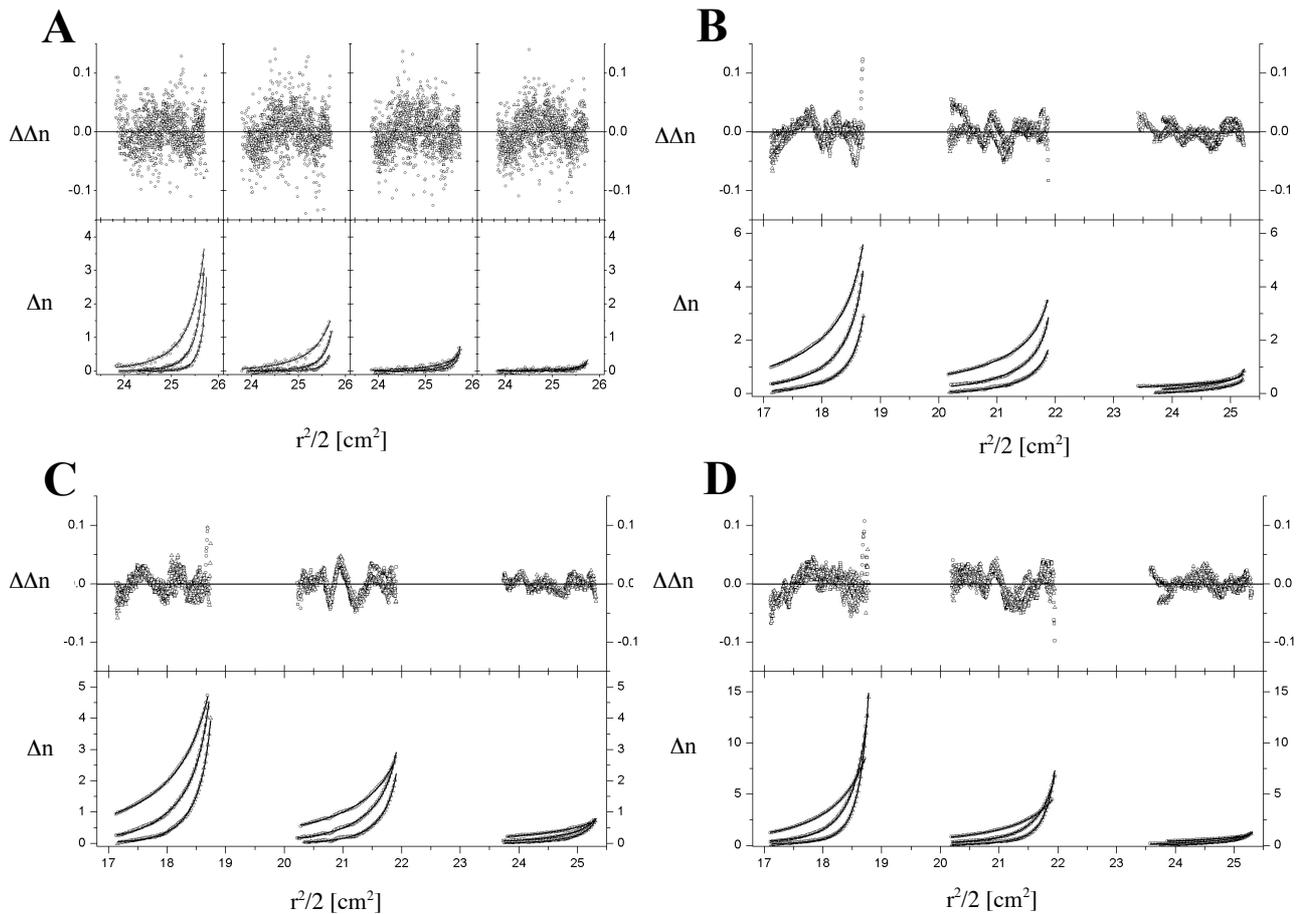


Abbildung 2.10. Sedimentationsgleichgewichts-Analyse mit His₆-rGNE-Fusionsprotein. Die Punkte sind experimentell gewonnene Daten, die Linien sind die theoretischen Werte des passendsten Modells. Zur besseren Veranschaulichung wird lediglich jeder fünfte Datenpunkt abgebildet. Unten sind die gemessenen Unterschiede (Δn) im Brechungsindex dargestellt. Oben sind die Abweichungen ($\Delta\Delta n$) der experimentellen Daten vom passendsten Modell aufgetragen. r ist der Abstand von der Rotationsachse. Detaillierte Fitting-Statistiken und gefittete Parameterwerte sind in Tabelle 2.4 und 2.5 aufgelistet. Die Daten wurden mit Hilfe der Interferenzoptik bei 4°C gesammelt. A: Präparation #1. His₆-rGNE alleine wurde in 4 verschiedenen Proteinkonzentrationen und bei 10000 (●), 15000 (■) oder 20000 rpm (▲) zentrifugiert. Passendstes Modell: Monomer-Dimer-Aggregate. B-D: Präparation #6. Die Proben wurden in 3 verschiedenen Proteinkonzentrationen und bei 6000 (●), 9000 (■) oder 12000 rpm (▲) zentrifugiert. B: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc. Passendstes Modell: Monomer-Tetramer-Aggregate. C: His₆-rGNE mit 0,1 mM CMP-Neu5Ac. Passendstes Modell: Monomer-Dimer-Tetramer-Aggregate. D: His₆-rGNE mit 10 mM UDP-GlcNAc und 0,1 mM CMP-Neu5Ac. Passendstes Modell: Monomer-Tetramer-Aggregate.

Die Messdaten des Sedimentationsgleichgewichtslaufs mit dem His₆-rGNE-Protein ohne Nukleotidzucker (A) sind stärker gestreut und weichen daher deutlich stärker vom Modell ab. Ursache für das höhere Rauschen der experimentellen Daten ist wahrscheinlich die erhöhte Aggregation des Proteins in Abwesenheit von Substrat und/oder Inhibitor. Die Abweichungen der experimentellen Daten zu den passendsten Modellen sind insbesondere bei den Experimenten B-D, die in ihrem Modell des Weiteren einen Tetramer-Zustand voraussetzen, sehr gering. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die maximale lokale Proteinkonzentration bei

den verschiedenen Gleichgewichtsexperimenten am höchsten ist, wenn sowohl UDP-GlcNAc als auch CMP-Neu5Ac vorlag. Da die Anfangskonzentration des Proteins bei den dargestellten Experimenten gleich war, kann dieser Effekt nur auf eine reduzierte Aggregationstendenz zurückzuführen sein. Die charakteristischen „Zickzack“-artigen Schwankungen der Varianz, die bei B-D besonders deutlich hervortreten, resultieren aus Fehlern der Interferenzoptik und sind nicht systematisch. Eine Auswahl verschiedener Oligomer-Modelle, mit denen die Daten der Sedimentationsgleichgewichts-Experimente gefittet wurden, wurde miteinander verglichen (Tabelle 2.4).

Bei Anwesenheit von UDP-GlcNAc lassen sich die untersuchten Gleichgewichtsgradienten am Besten mit einer Monomer-Tetramer- N_{HET} -Assoziation beschreiben, wobei kein oder nur sehr wenig Protein im dimeren Zustand vorkommt. Dieses Verhalten konnte unabhängig von den Anfangswerten für den Monomer-Dimer bzw. Monomer-Tetramer-Assoziationskoeffizienten beobachtet werden. Ein ähnliches Verhalten wurde bei Zugabe von UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac beobachtet (D). Auch hier ist das beste Modell, das die Daten beschreibt, eine Monomer-Tetramer- N_{HET} -Assoziation.

In Anwesenheit von nur CMP-Neu5Ac musste eine signifikante Menge an Dimer angenommen werden, um die experimentellen Daten befriedigend zu beschreiben. Die zusätzliche Annahme einer weiteren Spezies erhöhte die Komplexität des Modells (Monomer-Dimer-Tetramer- N_{HET}), so dass eine klare Unterscheidung zwischen den möglichen Modellen erschwert wurde. So bewegen sich die Varianzen für eine Monomer-Dimer-Trimer- N_{HET} -, Monomer-Dimer-Tetramer- N_{HET} - bzw. Monomer-Dimer-Hexamer- N_{HET} -Assoziation im gleichen Bereich. Da für all diese Modelle signifikante Mengen an Dimer-Protein angenommen werden müssen, wird aufgrund des Proteinverhaltens in Anwesenheit von UDP-GlcNAc bzw. UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac eine Monomer-Dimer-Tetramer- N_{HET} -Assoziation favorisiert.

Die hohe Komplexität der benutzten Modelle erschwert die quantitative Analyse der experimentellen Daten, was in einem Verlust der Reproduzierbarkeit der ermittelten Assoziationskoeffizienten resultiert (Tabelle 2.5). Das gewählte Modell konnte jedoch unabhängig von der Proteinpräparation reproduziert werden, was auf die Richtigkeit des Modells hindeutet.

Tabelle 2.4: Vergleich von gefitteten Oligomer-Modellen für die Sedimentationsgleichgewichtsläufe des His₆-rGNE-Proteins mit und ohne Substrat und/oder Inhibitor.

Präparation	Modell ^a	Varianz	Freiheitsgrade ^b	Eingesetzte Verdünnungen der His ₆ -rGNE-Proteinlösung	Rotationsgeschwindigkeiten in krpm
#1, His ₆ -rGNE	1 – 2 – N _{HET}	$1,1128 \times 10^{-3}$	4134	1:1/1:2/ 1:10/1:20	10/15/20
#2, His ₆ -rGNE	1 – 2 – N _{HET}	$1,3578 \times 10^{-4}$	4831	1:1/1:2/ 1:10/1:20	7/10/15/20
#3, His ₆ -rGNE	1 – 2 – N _{HET}	$1,4504 \times 10^{-4}$	5031	1:1/1:2/ 1:4/1:8/1:16	8/12/16
#4, His ₆ -rGNE/ UDP-GlcNAc	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$1,1475 \times 10^{-3}$	3358	1:1/1:2/1:10	7/10/14
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$1,0041 \times 10^{-3}$	3358		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$1,1491 \times 10^{-3}$	3358		
#6, His ₆ -rGNE/ UDP-GlcNAc	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$4,0293 \times 10^{-4}$	3028	1:1/1:2/1:10	6/9/12
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$2,9770 \times 10^{-4}$	3028		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$4,0359 \times 10^{-4}$	3030		
#4, His ₆ -rGNE/ CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$5,8772 \times 10^{-4}$	3411	1:1/1:2/1:10	7/10/14
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$5,7500 \times 10^{-4}$	3411		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$6,2906 \times 10^{-4}$	3411		
#5, His ₆ -rGNE/ CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$2,4675 \times 10^{-4}$	2675	1:1/1:2/1:10	6/9/12
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$2,4173 \times 10^{-4}$	2674		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$3,4718 \times 10^{-4}$	2674		
#6, His ₆ -rGNE/ CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$2,6260 \times 10^{-4}$	2970	1:1/1:2/1:10	6/9/12
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$2,6424 \times 10^{-4}$	2970		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$2,6778 \times 10^{-4}$	2970		
#4, His ₆ -rGNE/ UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$1,4021 \times 10^{-3}$	3292	1:1/1:2/1:10	7/10/14
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$1,0006 \times 10^{-3}$	3291		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$1,7076 \times 10^{-3}$	3293		
#5, His ₆ -rGNE/ UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$3,5612 \times 10^{-4}$	2667	1:1/1:2/1:10	6/9/12
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$2,7109 \times 10^{-4}$	2667		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	$5,3130 \times 10^{-4}$	2668		
#6, His ₆ -rGNE/ UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	1 – 2 – 3 – N _{HET}	$6,7279 \times 10^{-4}$	3101	1:1/1:2/1:10	6/9/12
	1 – 2 – 4 – N _{HET}	$3,2915 \times 10^{-4}$	3101		
	1 – 2 – 6 – N _{HET}	Keine Konvergenz	n.b.		

^a Das Symbol HET beschreibt nicht-äquilibrierende Aggregate, N beschreibt, dass die Stöchiometrie der Spezies im initialen Fitting-Schritt variabel blieb, der sich daraus ergebende Wert wurde anschließend fixiert. Alle aufgeführten Spezies wurde zunächst zum Fitten einbezogen und anschließend wieder ausgegliedert, um zu prüfen, ob ihre Verteilung zum Signal vernachlässigbar ist.

^b Bei zu geringer lokaler Aggregatkonzentration wurde diese Spezies beim Fitten ausgeschlossen, was in diesen Fällen zur Erhöhung der Freiheitsgrade führt.

n.b. nicht bestimmbar

Tabelle 2.5: Assoziationskoeffizienten der gefitteten Modelle für die Sedimentationsgleichgewichts-Experimente

Präparation	K_A Monomer - Dimer [M^{-1}]	K_A Monomer - Tetramer [M^{-3}]
#1, His ₆ -rGNE	$5,3 \times 10^5$	n.b.
#2, His ₆ -rGNE	$70,4 \times 10^5$	n.b.
#3, His ₆ -rGNE	$5,1 \times 10^5$	n.b.
#4, His ₆ -rGNE/UDP-GlcNAc	$7,9 \times 10^4$	$8,3 \times 10^{15}$
#6, His ₆ -rGNE/UDP-GlcNAc	n.b.	$3,7 \times 10^{15}$
#4, His ₆ -rGNE/CMP-Neu5Ac	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{16}$
#5, His ₆ -rGNE/CMP-Neu5Ac	$14,4 \times 10^5$	2×10^{18}
#6, His ₆ -rGNE/CMP-Neu5Ac	$21,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{17}$
#4, His ₆ -rGNE/UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	n.b.	$1,4 \times 10^{16}$
#5, His ₆ -rGNE/UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	n.b.	$2,6 \times 10^{16}$
#6, His ₆ -rGNE/UDP-GlcNAc + CMP-Neu5Ac	n.b.	$6,6 \times 10^{15}$

n.b. nicht bestimmbar

2.2.3 Bestimmung des oligomeren Zustands des GNE-Proteins mittels Gelfiltration

Eine weitere Methode, die Auskunft über die Modalität einer Lösung bzw. über den oligomeren Zustand gibt, ist die Technik der Gelfiltration. Absorptionspeaks der Proteine können durch den Einsatz von Standardproteinen Molekulargewichten zugeordnet werden. Zur Überprüfung des oligomeren Zustands und der Modalität wurde zunächst das rekombinante His₆-rGNE-Protein untersucht, im weiteren Verlauf wurden auch andere GNE-Konstrukte sowie natives Protein aus der Ratten- und Mäuseleber mit dieser Technik analysiert.

2.2.3.1 Gelfiltrationsanalyse des gereinigten rekombinanten His₆-rGNE-Fusionsproteins

Die rekombinante His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase der Ratte wurde mit einer Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule analysiert (Abbildung 2.11). Der Elutionsverlauf des Fusionsproteins zeigte einen großen Peak bei 10,9 ml, was einem Molekulargewicht von 355 kDa entspricht. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines His₆-UDP-

GLcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Monomers (85,4 kDa) und der ermittelten Molekulargewichte gibt den oligomeren Zustand des Proteins wieder, der in diesem Fall bei 4,2 liegt. In acht unabhängigen Gelfiltrationsexperimenten wurde ein mittleres Molekulargewicht von $340,6 \pm 23,3$ kDa ermittelt, was einem Quotienten von $4,0 \pm 0,3$ entspricht. Danach liegt die gereinigte His₆-UDP-GLcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase vorwiegend als Tetramer vor.

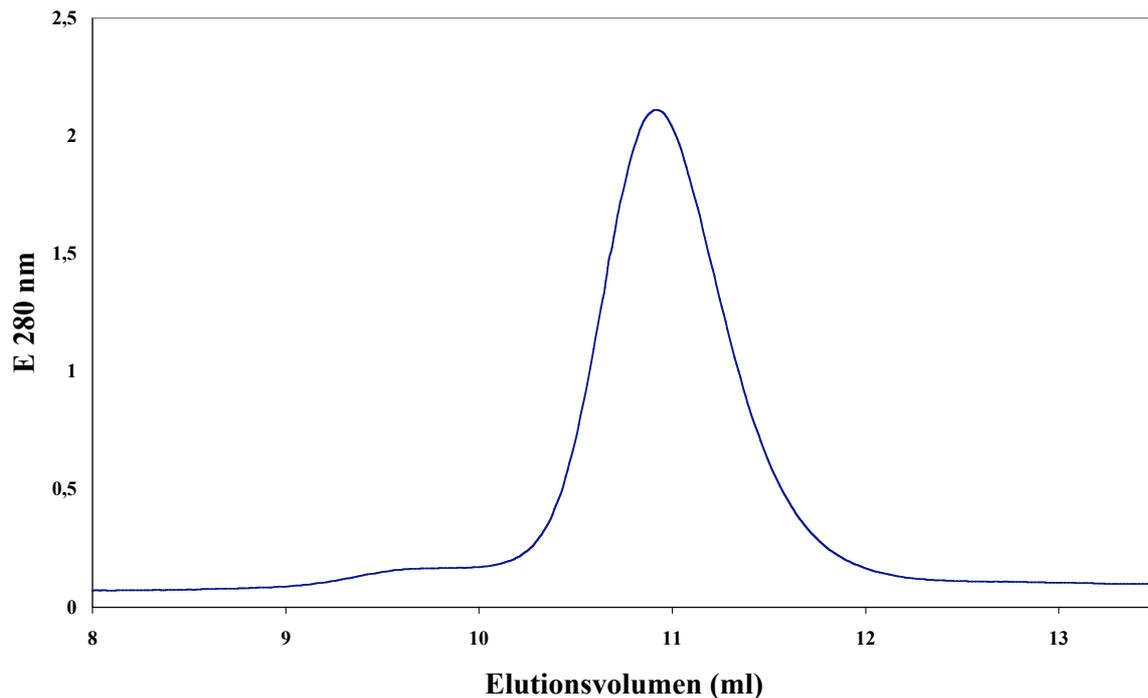


Abbildung 2.11: Gelfiltrationsanalyse des gereinigten Fusionsproteins His₆-UDP-GLcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase. Das gereinigte Protein wurde über eine Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule gegeben. Durch Absorptionmessung bei 280 nm wurde der Elutionsverlauf dokumentiert.

2.2.3.2 Gelfiltrationsanalyse der gereinigten rekombinanten StrepII-rGNE-Fusionsproteine

Die gereinigten rGNE-StrepII-Fusionsproteine wurden über eine Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule analysiert. In Abbildung 2.12 wurden die relativen Absorptionen aller StrepII-Fusionsproteine aufgetragen. Das schwach aktive Fusionsprotein rGNE-Strep-C weist lediglich einen Peak bei 8,9 ml auf, während die beiden anderen StrepII-Fusionsproteine neben diesem Peak drei weitere besitzen, nämlich bei einem Elutionsvolumen von 11,4 ml, 12,7 ml und 14,4 ml (bei rGNE-Strep-C) bzw. 11,4 ml, 12,5 ml und 14,1 ml (bei His₆-rGNE-Strep-N). Der Peak bei 11,4 ml nimmt bei den Konstrukten rGNE-Strep-C und His₆-rGNE-

Strep-N den größten Anteil ein. Durch den Einsatz eines Gelfiltrationsstandards konnten den einzelnen Peaks Molekulargewichte und damit oligomere Zustände zugeordnet werden (Tabelle 2.6).

In allen gereinigten StrepII-Fusionsproteinen wurden Aggregate mit einem Molekulargewicht >1000 kDa detektiert, beim Fusionsprotein rGNE-Strep-C lag das Fusionsprotein ausschließlich aggregiert vor (Subpopulation Nr. 4). Dagegen wurden bei den Konstrukten rGNE-Strep-N und His₆-rGNE-Strep-N drei weitere Subpopulationen detektiert. Die größten Anteile hat dabei die Subpopulation Nr. 3, die der Größe eines Tetramers entspricht. Ein geringerer Teil des Proteins lag in kleineren oligomeren Zuständen vor (Subpopulation Nr. 1 und Nr. 2), bei denen es sich um monomeres und dimeres Protein handelt. Der Anteil an monomerem bzw. dimerem Protein ist insbesondere beim Fusionsprotein rGNE-Strep-N hoch. Bei einem anschließenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitätsassay der eluierten Fraktionen konnte jeweils nur ein Aktivitätspeak ermittelt werden, der mit dem Absorptionspeak des Tetramers übereinstimmte (Daten nicht gezeigt).

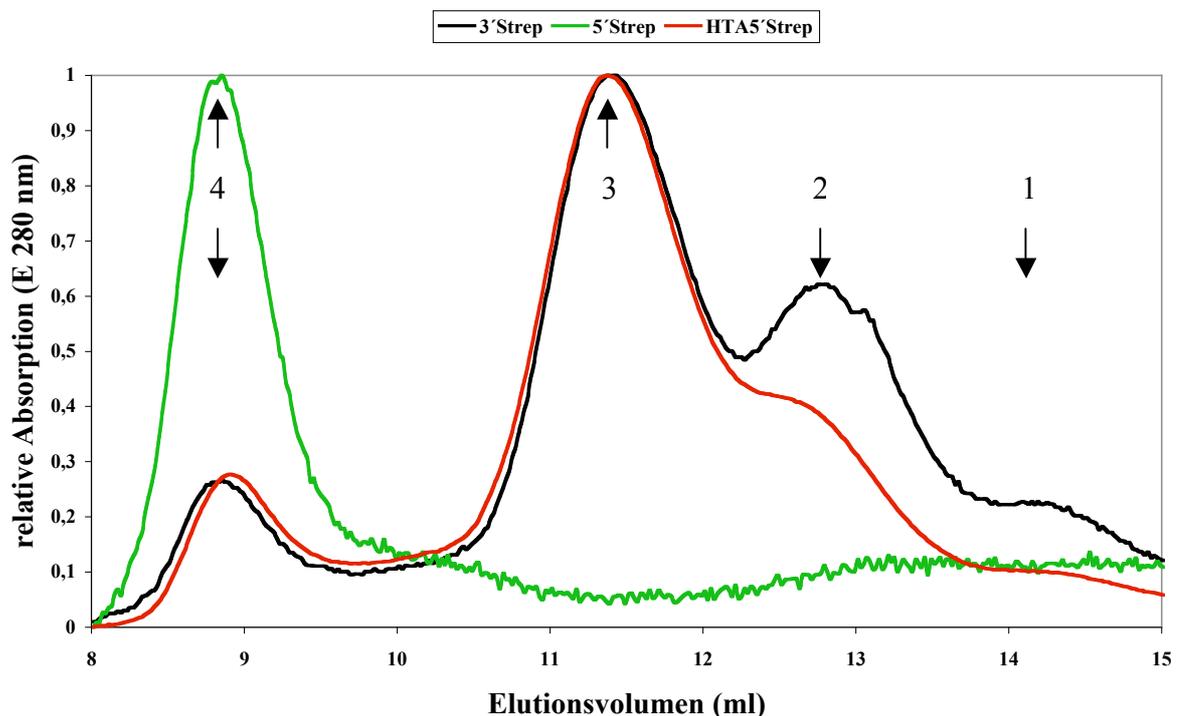


Abbildung 2.12: Gelfiltrationselutionsprofile der gereinigten Fusionsproteine rGNE-Strep3', rGNE-Strep5' und His₆-rGNE-Strep5'. Aufgetragen wurde jeweils die Absorption bei 280 nm, wobei die höchste gemessene Absorption eines jeden Laufs gleich 1 gesetzt wurde. Die detektierten Peaks der 4 Subpopulationen der StrepII-Fusionsproteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Tabelle 2.6: Ermittelte Proteingrößen der Fusionsproteine rGNE-Strep3', rGNE-Strep5' und His₆-rGNE-Strep5' sowie Bestimmung der oligomeren Zustände der Proteine.

	Subpopulationen: M _W gemessen in kDa				Quotient aus M _W gemessen / M _W mono			
	Subpo- pulation Nr. 1	Subpo- pulation Nr. 2	Subpo- pulation Nr. 3	Subpo- pulation Nr. 4	Subpo- pulation Nr. 1	Subpo- pulation Nr. 2	Subpo- pulation Nr. 3	Subpo- pulation Nr. 4
rGNE- Strep3'	—	—	—	>1000	—	—	—	>12
rGNE- Strep5'	79	174	340	>1000	1,0	2,2	4,2	>12
His ₆ -rGNE- Strep5'	91	199	347	>1000	1,1	2,3	4,0	>12

2.2.3.3 Gelfiltrationsanalyse des rekombinanten rGNE-Proteins

In Insektenzellen rekombinant exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ohne Fusionsteil wurde durch MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie partiell gereinigt (siehe 2.1.1). UDP-GlcNAc-2-Epimerase-aktive Fraktionen wurden vereinigt und über eine Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule gegeben. Zur besseren Detektion des rGNE-Proteins wurde neben dem Elutionsprofil des partiell gereinigten Proteins auch hier ein UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivitätsassay mit Aliquots der Fraktionen durchgeführt (Abbildung 2.13). Das Chromatogramm des rekombinanten rGNE-Proteins ohne Fusionsteil zeigt einen Absorptionspeak bei 11,0 ml, der mit der gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität der entsprechenden Fraktionen korreliert. Das Protein besitzt demnach ein Molekulargewicht von 333 kDa. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines rGNE-Monomers (79,2 kDa) und dem ermittelten Molekulargewicht von 333 kDa ergibt 4,2, was annähernd einem Tetramer entspricht.

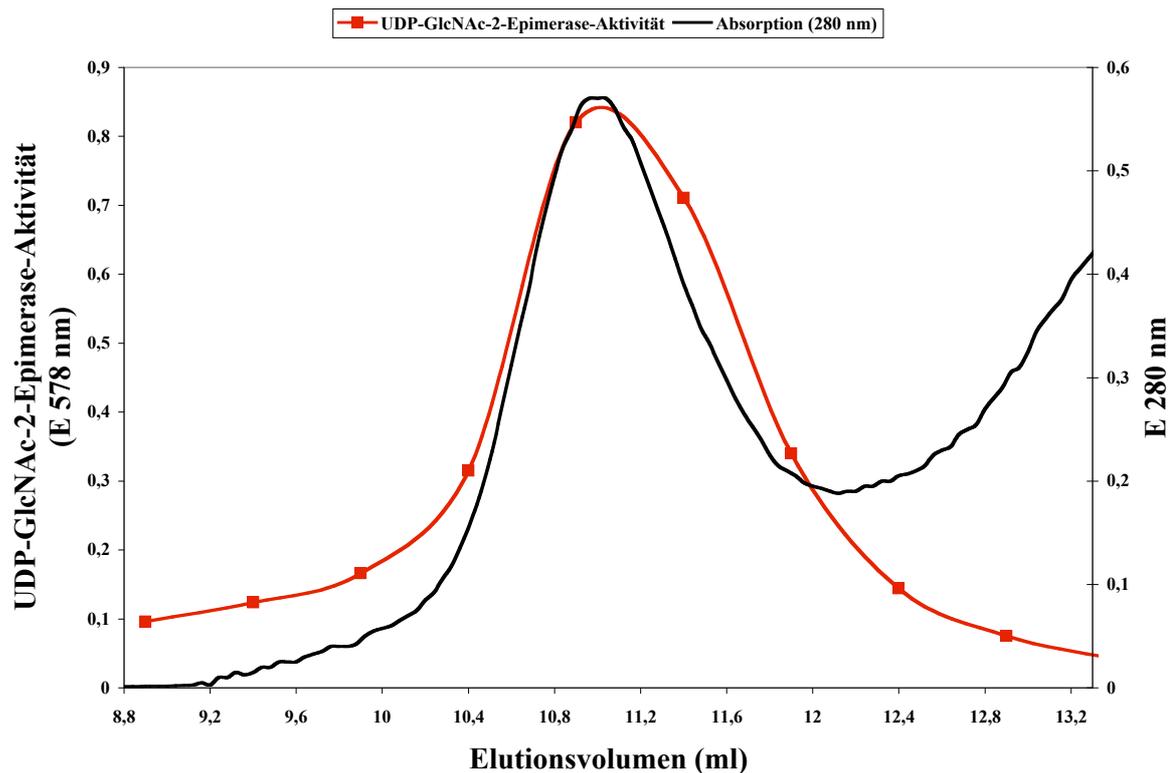


Abbildung 2.13: Gelfiltrationsanalyse des partiell gereinigten rGNE-Proteins. Mittels einer MonoQ-Chromatographie wurde zunächst das rekombinante rGNE-Protein aus Insektenzellen partiell gereinigt. Das Molekulargewicht des rGNE-Proteins wurde anschließend mit einer Superdex[®]200-Gelfiltrationssäule ermittelt. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität wurde colorimetrisch bestimmt.

2.2.3.4 Gelfiltrationsanalyse des nativen rGNE-Proteins aus Rattenlebercytosol

Proteine aus frisch präpariertem Rattenlebercytosol wurden durch die Gelfiltration getrennt. Zur Detektion des aktiven rGNE-Proteins wurde anschließend in den Fraktionen zweier unabhängiger Experimente die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität bestimmt (Abbildung 2.13). Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde etwa nach 10,9 ml bzw. 11,4 ml eluiert, was in Bezug auf den Größenstandard einer Größe von 379 kDa bzw. 281 kDa entspricht. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Monomers (79,2 kDa) und der ermittelten Molekulargewichte gibt den oligomeren Zustand des Proteins wieder, der für die zwei Versuche bei 4,8 bzw. 3,6 liegt.

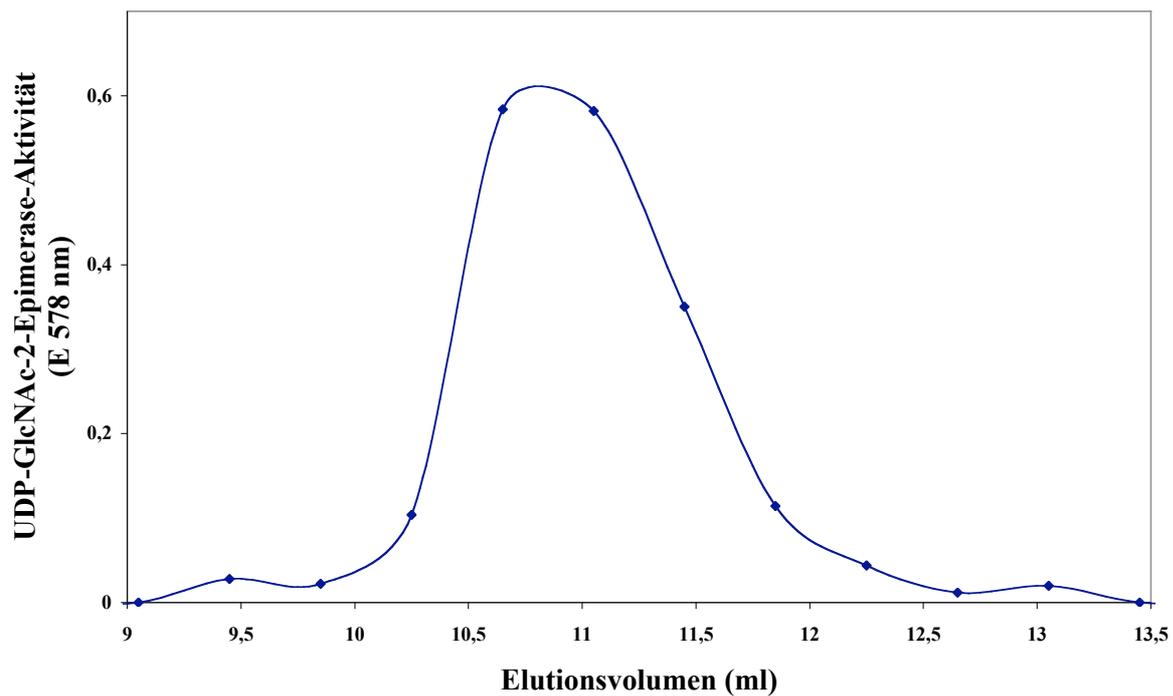
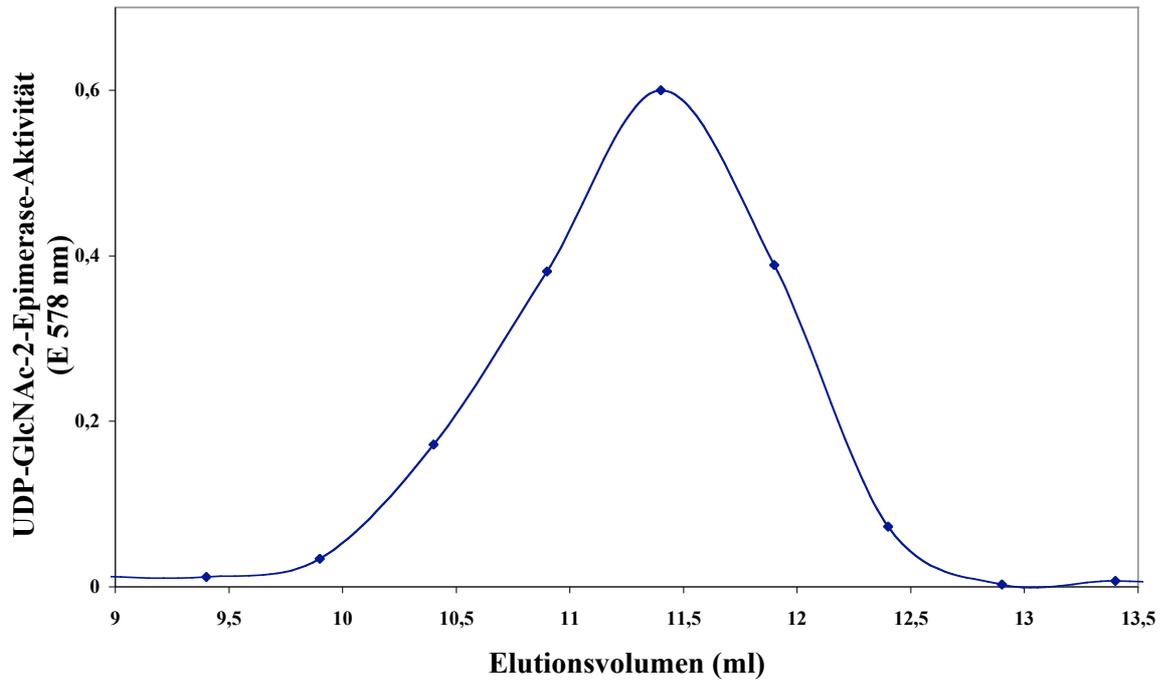


Abbildung 2.14: Zwei unabhängige Gelfiltrationsexperimente zur Ermittlung des oligomeren Zustands der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenlebercytosol. 1 g Leber wurde homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Superdex[®]200-Säule gegeben. In den Fraktionen wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität colorimetrisch ermittelt.

2.2.3.5 Gelfiltrationsanalyse des nativen mGNE-Proteins aus Mäuselebercytosol

Analog zur Ermittlung des oligomeren Zustandes der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Rattenlebercytosol wurde natives GNE-Protein in Mäuselebercytosol (mGNE) über eine Superdex®200-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Zur Detektion des Proteins wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität in den gewonnenen Fraktionen bestimmt (Abbildung 2.15). Zur besseren Bestimmung des Aktivitätspeaks wurde die Fraktionsgröße auf 0,1 ml reduziert. Die native UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Mäuselebercytosol wird zwischen 11,0 und 11,2 ml eluiert. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 309 bis 340 kDa. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Monomers (79,2 kDa) und der ermittelten Molekulargewichte gibt den oligomeren Zustand des Proteins wieder, der zwischen 3,9 und bei 4,3 liegt.

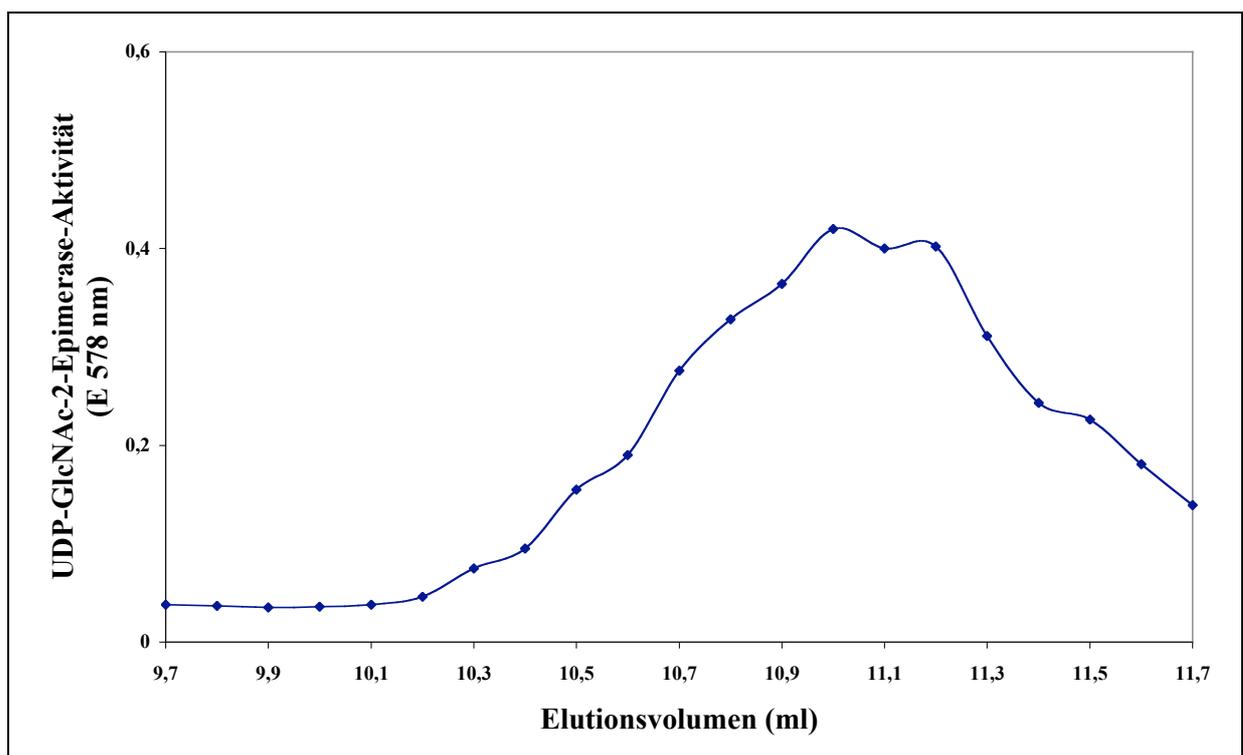


Abbildung 2.15: Gelfiltrationsexperiment zur Ermittlung des oligomeren Zustands der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Mäuselebercytosol. 1 g Leber wurde homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Superdex®200-Säule gegeben. In den Fraktionen wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität colorimetrisch ermittelt.