

3 Diskussion

3.1 Expression und Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Für das Verständnis der Struktur, Funktionsweise und Regulation der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist die Reinigung von mehreren Milligramm des Enzyms unerlässlich. Insbesondere für die angestrebte Kristallisation des rGNE-Proteins werden größere Proteinmengen benötigt. Da aus Rattenlebercytosol nicht die benötigten Proteinmengen isoliert werden konnten (100 µg/20 g Rattenleber; Hinderlich *et al.*, 1997), wurde zunächst ein Reinigungsschema für das rekombinant exprimierte rGNE-Protein ohne Fusionsteil erarbeitet. Die Überexpression des Enzyms in Insektenzellen wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems gewährleistet, welches im Vergleich zu anderen getesteten Expressionssystemen (*E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*; Blume *et al.*, 2004) eine 50-250-fach höhere Expressionsrate von rGNE-Protein aufweist.

Zur Reinigung des rGNE-Proteins wurden die Trennungseigenschaften von verschiedenen säulenchromatographischen Reinigungsmethoden kombiniert genutzt. Als Basismethode etablierte sich die Reinigung über MonoQ-Chromatographie und Gelfiltration, bei der zu 90% reines Protein isoliert werden konnte. Erfolgreich ergänzt wurde diese Methode durch Vorschalten einer Phenylsepharose- bzw. Nachschalten einer ATP-Agarose-Chromatographie, wodurch die Reinheit des Enzyms fast bis zur Homogenität gesteigert werden konnte. Jedoch unterschieden sich die beiden Reinigungsschemata erheblich in der Quantität und Qualität des gereinigten rGNE-Proteins. So konnten mittels der vorgeschalteten Phenylsepharose-Säule 300 bis 400 µg pro 100 ml Insektenzellkultur enzymatisch aktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase gereinigt werden, während mit Hilfe der ATP-Agarose-Säule lediglich 80 µg Protein gewonnen wurden, deren Enzymaktivitäten unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Ursache für den Aktivitätsverlust des rGNE-Proteins war möglicherweise das Arbeiten mit UDP-freien Puffern sowohl bei ATP-Agarose-Affinitätschromatographie als auch bei der vorgeschalteten Gelfiltration. In Anwesenheit von UDP würde es mit dem gebundenen ATP der Affinitätssäule um die Nukleotidbindestelle konkurrieren und damit die Bindung des rGNE-Proteins stark beeinträchtigen. Trotz des Arbeitens mit UDP-freiem Puffer war die beobachtete Bindung des Enzyms an die ATP-Agarose-Säule sehr schwach. Da eine Vielzahl verschiedener getesteter ATP-, aber auch ADP- und UDP-Agarosen sowie die Red- und Blue-Sepharose, die Affinität zu Nukleotidbindenden Proteinen besitzen, eine ähnlich schlechte Bindung zeigten, sind wahrscheinlich nicht die Eigenschaften der Säulenmatrices sondern die des rekombinanten rGNE-Proteins

dafür verantwortlich. Anders als das rekombinante bindet das native rGNE-Protein aus Rattenleber an ATP-Agarose, so dass diese Methode für ihre Reinigung genutzt werden konnte (Hinderlich *et al.*, 1997). Die Unzugänglichkeit der Nukleotid- bzw. Nukleotidzucker-Bindungstaschen des rekombinanten rGNE-Proteins könnte ein Grund für die schlechte Interaktion zwischen ihr und den durch die Matrix gebundenen Nukleotiden sein. Als Ursache für die nicht freie Zugänglichkeit kommen posttranslationale Modifikationen des Insektenzellsystems in Betracht. Möglich wäre auch, dass nur falsch gefaltene rGNE-Proteine an die Säule gebunden haben, was den Verlust der gereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase erklären könnte.

Neben der Reinigung von rGNE ohne Fusionsteil wurden auch Reinigungsansätze für das rGNE-Protein mit einem StrepII-Fusionsteil verfolgt, um die Effizienz weiter zu steigern. Dazu wurden drei StrepII-rGNE-Konstrukte generiert, exprimiert und gereinigt, bei denen dem rGNE-Protein N- bzw. C-terminal ein StrepII-Fusionsteil hinzugefügt wurde. Beim His₆-rGNE-Strep-N-Konstrukt wurde der N-terminale StrepII-Tag noch durch einen His₆-Fusionsteil ergänzt. Die effektivste Reinigung über eine StrepTaktin-Säule wurde mit dem His₆-rGNE-Strep-N-Konstrukt erzielt, bei dem aus 100 ml Insektenzellkultur 0,18 mg lösliches und aktives Protein mit einer Reinheit von etwa 90% gewonnen werden konnte. Verluste von fast 90% zu der zuvor im Cytosol gemessenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität während der StrepTaktin-Affinitätschromatographie lassen in Bezug auf das His₆-rGNE-Strep-N-Protein auf eine minder effiziente Bindung des StrepII-Fusionsteils am Säulenmaterial schließen. Die StrepII-Konstrukte rGNE-Strep-N und rGNE-Strep-C zeigten während der Reinigung sogar Verluste von über 95%. Der Grund hierfür ist möglicherweise, dass der rGNE-Anteil die Interaktion zwischen dem nur 8 Aminosäuren kurzen StrepII-Fusionsteil und der StrepTaktin-Säule sterisch behindert. Offensichtlich begünstigt der N-terminale His-Fusionsteil beim His₆-rGNE-Strep-N-Konstrukt die Bindung des StrepII-Fusionsteils an eine StrepTaktin-Säule. Denkbar wäre, dass der 6 kDa große His-Fusionsteil, der eine größtenteils ungeordnete Sekundärstruktur besitzt, eine größere räumliche Distanz vom rGNE-Teil und StrepII-Tag bewirkt, die zu einer besseren Zugänglichkeit des StrepII-Fusionsteils führen. Aus dem Durchlauf einer solchen His₆-rGNE-Strep-N-Reinigung konnte mittels einer anschließenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie mehr His₆-rGNE-Strep-N-Protein isoliert werden, als bei der zuvor durchgeführten StrepTaktin-Affinitätschromatographie. Demnach ist zur Reinigung des rekombinanten rGNE-Proteins die Ni-NTA- gegenüber der StrepTaktin-Affinitätschromatographie besser geeignet.

Um die Effizienz weiter zu steigern, wurde ein zusätzlicher Reinigungsansatz für das rGNE-

Protein nur mit einem N-terminalen His₆-Fusionsteil verfolgt. Dabei konnten aus 100 ml Insektenzellkultur mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie 5 mg bis zu 99% reines, lösliches und aktives His₆-rGNE-Protein isoliert werden. Die effektivste Methode zur Gewinnung größerer Mengen gereinigtem rGNE-Protein stellt damit die Reinigung des His₆-rGNE-Proteins mittels der Ni-NTA-Affinitätschromatographie dar. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das His₆-rGNE-Protein detailliert charakterisiert.

3.2 Struktur und Regulation der rGNE

3.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Auf dem Weg zu einem Proteinkristall spielt die Monomodalität der Proteinlösung eine zentrale Rolle und muss daher gewährleistet sein. Detaillierten Aufschluss darüber liefert die dynamische Lichtstreuung (DLS), die als nicht-invasive Technik zur Charakterisierung von Proteinlösungen vor Kristallisations-Screenings genutzt wird. In DLS-Experimenten konnten in der His₆-rGNE-Proteinlösung drei Partikelpopulationen verschiedener Größe detektiert werden. Da die Proteinlösung zuvor zentrifugiert und der Überstand anschließend sterilfiltriert wurde, kann eine Kontamination der Proteinlösung durch nicht-lösliche größere Partikel ausgeschlossen werden. Bei der DLS-Messmethodik sind die Streu- und damit die Signalintensität proportional zu der sechsten Potenz des Stokes-Radius und daher als Technik sehr empfindlich gegenüber Aggregaten. Andererseits können kleinere Partikel nur detektiert werden, wenn sie weit überwiegen. Das Vorhandensein kleinerer oligomerer Zustände als die detektierte Hauptpopulation mit einem Molekulargewicht von etwa 330 kDa ist daher nicht ausgeschlossen. Die zwei größeren Partikelpopulationen mit einem Stokes-Radius von 60 und 205 nm, die zusammen einen Anteil von 12,2% der Gesamtpartikelmenge einnehmen (Tabelle 2.2), sind offensichtlich hochmolekulare, aber noch lösliche Aggregate des rGNE-Proteins. Als alleiniger Verursacher der Aggregation des His₆-rGNE-Proteins kann der His₆-Fusionsteil ausgeschlossen werden, da die Aggregatbildung auch bei anderen rGNE-Proteinkonstrukten nachgewiesen wurde. So weisen der unlösliche Teil von Cytosolpräparationen des rGNE-Proteins ohne Fusionsteil sowie alle StrepII-Konstrukte mehr als 10% des exprimierten rekombinanten Enzyms auf. Die Instabilität des Proteins beruht offensichtlich auf der Struktur des rekombinanten Proteins. Da auch in anderen Expressionssystemen (*E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*; Blume *et al.*, 2004) eine starke Aggregatbildung des rGNE-Proteins beobachtet wurde, andererseits aber aktives Protein isoliert werden konnte, sind posttranslationale Modifikationen als Ursache der Aggregation unwahrscheinlich. Überraschenderweise verliert das rGNE-Protein im aggregierten Zustand seine Enzymaktivität nicht vollständig.

Wahrscheinlich bleiben die für das Substrat zugänglichen Proteinmoleküle der Aggregatoberfläche aktiv.

Die bei der dynamischen Lichtstreuung größte Partikelpopulation mit einem Anteil von 87,8% hat einen berechneten Stokes-Radius von etwa 7,1 nm. Hervorzuheben ist, dass diese Population im Gegensatz zu den detektierten Aggregaten keine Polydispersität aufweist (Tabelle 2.6). Es handelt sich also nicht wie bei den Aggregaten um ein Gemisch verschiedener Populationen sondern lediglich um eine Partikelgröße. Bei globulären Proteinen kann über den Stokes-Radius unter Berücksichtigung der Hydrathülle, die von den jeweiligen Pufferbedingungen abhängen, das Molekulargewicht des globulären Proteins ermittelt werden (für globuläre Proteine gilt: $MW = (1,68 \times R_S)^{2,3394}$; MW: Molekulargewicht in kDa, R_S : Stokes-Radius in nm). Nimmt man für das His₆-rGNE-Protein eine globuläre Struktur an, so hat es bei dem berechneten Stokes-Radius ein Molekulargewicht von 334 kDa. Die berechnete Größe entspricht entgegen Ergebnissen früherer Arbeiten (Hinderlich *et al.*, 1997; Effertz *et al.* 1999) nicht einem hexameren rGNE-Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 512 kDa, sondern einem Tetramer, welches theoretisch ein Molekulargewicht von 341 kDa besitzt. Dies ist ein starker Hinweis, dass das rGNE-Protein vorwiegend ein Tetramer ist.

3.2.2 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) und Gelfiltration (SEC)

Die analytische Ultrazentrifugation eignet sich gut zur Bestimmung des oligomeren Zustands von Proteinen (Lebowitz *et al.*, 2002). Bei den Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten zeigte sich eine hoch heterogene Mischung von Partikelpopulationen, obwohl zuvor größere Partikel in der Proteinlösung durch eine vorgeschaltete Zentrifugation entfernt wurden. Die Zugabe des allosterischen Inhibitors CMP-Neu5Ac sowie des Substrates UDP-GlcNAc reduzierte die Komplexität der c(S)-Verteilung des rGNE-Proteins; der Aggregatanteil verringerte sich um 9% bzw. 39%. Die größte Reduktion der Aggregatbildung mit 52% wurde bei Zugabe beider Nukleotidzucker beobachtet. Offensichtlich wirken beide Nukleotidzucker unabhängig voneinander stabilisierend auf die Quartärstruktur des GNE-Enzyms. Diese Beobachtungen legen die Anwesenheit von zwei unabhängigen Bindungsstellen für UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac nahe. Die CMP-Neu5Ac-Bindestelle wird aufgrund von Punktmutanten, die in Zellen den Sialurie-Phänotyp verursachen, zwischen den Aminosäuren 249 und 275 vermutet (Yarema *et al.*, 2001). Die beteiligten Aminosäuren der UDP-GlcNAc-Bindestelle sind nicht auf einen kleinen Sequenzabschnitt beschränkt, sondern wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 1-220 verteilt; Punktmutanten der Aminosäuren Lys24, His45, 66

His110, Asp112, His132, Glu134, Asp143, His155, His157 und His220 besaßen keine oder sehr schwache UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität (Effertz *et al.*, 1999; siehe auch 3.3) und sind somit essentiell für die Substratbindung bzw. den Katalysemechanismus.

Sedimentationsgleichgewichts-Experimente bestätigten erneut die Oligomodalität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Lösung sowie die positiven Stabilitätseffekte der zugesetzten Nukleotidzucker UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac. Aus den Ein-Spezies-Fits konnte die Konzentrations- und Geschwindigkeits-Abhängigkeit des gemittelten Molekulargewichtes, welches sich in dem Quotienten $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$ ausdrückt, ermittelt werden. So verschob sich durch Erhöhung der Proteinkonzentration das Gleichgewicht der verschiedenen oligomeren Zustände in Richtung höhermolekularer Partikel. Eine Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit führte u.a. zu einer verstärkten Sedimentation hochmolekularer Aggregate, die in die Berechnung des Quotienten nicht mehr einbezogen werden konnten, was ebenfalls in einer Reduktion des Quotienten $\sigma_{\text{fit}}/\sigma_{\text{calc}}$ resultierte. Die Zugabe von Substrat und/oder Inhibitor (Abbildung 2.9, B-D) erhöhte das mittlere Molekulargewicht der Gesamtpopulation und weist ebenfalls auf eine Stabilisierung höherer Oligomerstrukturen hin. Die experimentellen Daten konnten je nach An- oder Abwesenheit von UDP-GlcNAc mit der kleinsten Varianz an ein dynamisches Gleichgewichtsmodell aus Monomer und Tetramer bzw. Monomer, Dimer und Tetramer gefittet werden. Bei Abwesenheit von Nukleotidzuckern wurde ein Monomer-Dimer- N_{HET} -Gleichgewicht angenommen, wobei höhere definierte Zustände wie Hexamere und Oktamere nicht ausgeschlossen sind, jedoch für die detaillierte Detektion zu instabil waren. Bei allen Modellen musste zur Beschreibung der experimentellen Daten zusätzlich eine Population von nicht äquilibrierbaren Aggregaten angenommen werden. Aufgrund des Verhaltens von rGNE bei Anwesenheit von UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac wird ein Monomer-Dimer-Tetramer- N_{HET} -Gleichgewicht favorisiert.

Neben der detektierten Reduktion des Aggregatanteils verschiebt UDP-GlcNAc das Gleichgewicht vom dimeren zum tetrameren Zustand. Die Assoziation von Dimeren zu einem Tetramer bei Zugabe des Substrates UDP-GlcNAc wird hiermit erstmals beim rekombinanten His₆-rGNE-Protein beobachtet. Aus früheren Experimenten mit rGNE-Protein aus Rattenlebercytosol ist bereits bekannt, dass Dimere in Anwesenheit von UDP-GlcNAc zu einem höher oligomeren Zustand assoziieren (Hinderlich *et al.*, 1997). Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass der oligomere Zustand des rGNE-Proteins über die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne bestimmt wird und sich durch Zugabe von UDP-GlcNAc, dem Substrat der Epimerasereaktion, das Gleichgewicht in Richtung des Epimerase-aktiven Zustandes bewegt.

Wie UDP-GlcNAc erhöht auch CMP-Neu5Ac den Tetrameranteil auf Kosten des Aggregat- und Dimeranteils, jedoch ist der stabilisierende Effekt auf den tetrameren Zustand nicht so stark wie bei Zugabe von UDP-GlcNAc. So musste zur Beschreibung der AUZ-Daten eine Population von dimerem His₆-rGNE-Protein einbezogen werden. Die stabilisierenden Wirkungen von UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac auf den tetrameren Zustand addieren sich bei Zugabe beider Nukleotidzucker, auch wenn sich dieser additive Effekt schwer quantifizieren lässt. So wurde bei gleichen Proteinkonzentrationen zu Beginn der AUZ-Experimente die höchste lokale Proteinkonzentration erreicht, wenn beide Liganden in der Proteinlösung vorlagen (siehe Abbildung 2.10.D), was auf eine reduzierte Neigung zur Aggregatbildung und Reduktion des dimeren Anteils zurückzuführen ist. Somit konnte auch bei den Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten eine unabhängige Beeinflussung beider Nukleotidzucker hin zum tetrameren Zustand beobachtet werden, was erneut ein Indiz für zwei unabhängige Bindungsstellen für UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac ist.

An dieser Stelle muss hervorgehoben werden, dass die Sedimentationsgleichgewichts-Analyse bei dem Gleichgewichtssystem des His₆-rGNE-Proteins an ihre methodische Grenze stößt, da die Anwesenheit mehrerer assoziierender Partikelpopulationen in Verbindung mit irreversibler Aggregation das System höchst komplex macht. Zwar zeigen die ermittelten quantitativen Daten (Tabelle 2.4) eine fehlende Reproduzierbarkeit unabhängiger Experimente, jedoch konnte das Modell einer Monomer-Tetramer-N_{HET}- bzw. Monomer-Dimer-Tetramer-N_{HET}-Assoziation qualitativ reproduziert werden. Zur Analyse von komplexen Systemen eignen sich Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente prinzipiell besser, aber bei dem rGNE-Protein existieren aufgrund der fortlaufenden Aggregation und der unbekanntenen Assoziations- und Dissoziation-Kinetiken für eine detaillierte Analyse zu viele Unbekannte.

Zur Analyse des oligomeren Zustands wurde weiterhin die Gelfiltration (Size-Exclusion-Chromatography = SEC) eingesetzt. Die SEC-Methodik arbeitet wie die Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation nicht im Gleichgewicht und ist daher zur Charakterisierung von dynamischen Systemen nur bedingt geeignet. Fortwährende Änderungen des oligomeren Zustands während eines SEC-Experiments würden den Peak verschieben und strecken. Da jedoch die Reassoziations- von Dimeren zu dem Epimerase-aktiven Zustand des rGNE-Proteins als sehr langsam beschrieben ist (über 2 h für 50% Reassoziations; Hinderlich *et al.*, 1997), kann zumindest die Reassoziations- für den Verlauf eines 20-minütigen SEC-Experiments vernachlässigt werden. Die Aggregation dagegen kann wesentlich schneller ablaufen und somit das Elutionsprofil beeinflussen. Der in früheren Arbeiten ermittelte Hexamer-Peak des

rGNE-Proteins könnte demnach ein Misch-Peak aus Tetrameren und während des SEC-Experiments entstandenen Aggregaten sein. Mit dieser Technik, die durch Aktivitätsanalysen ergänzt wurde, konnte die oligomere Struktur einer Vielzahl von verschiedenen rGNE-Konstrukten als auch natives GNE-Protein aus Ratten- und Mäuselebercytosol charakterisiert werden. Abgesehen von einigen rGNE-Punktmutanten (siehe 3.3) und des rGNE-Strep-N-Proteins konnte bei allen Konstrukten ein Peak als Hauptpopulation detektiert werden, der einem Tetramer entspricht. Der tetramere Zustand des rGNE-Proteins als dominierende Spezies konnte damit auch mittels der SEC-Experimente bestätigt werden. Der Anteil der oligomereren Zustände bzw. von Aggregaten schwankt jedoch erheblich je nach Fusionsteil. Das rGNE-Protein mit einem His₆-Fusionsteil zeigt bei den SEC-Experimenten neben der dominierenden Tetramer-Spezies auch eine Schulter im Elutionsverlauf, die Aggregaten entspricht, während SEC-Daten von His₆-rGNE-Strep-N- und rGNE-Strep-C-Protein zusätzlich einen Mono- und Dimer-Peak aufweisen. Vernachlässigt man die schwache Restaktivität von Aggregaten, besitzt nur das tetramere rGNE-Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Die Enzymaktivität spiegelt demnach annähernd das Verhältnis von Tetramer zu anderen Spezies wider. Für gereinigtes rekombinantes rGNE-Protein wurden Epimerase-Aktivitäten von bis zu 5000 mU/mg beobachtet, His₆-rGNE hat eine durchschnittliche Aktivität von 950 mU/mg, His₆-rGNE-Strep-N rund 900 mU/mg, rGNE-Strep-C ca. 260 mU/mg und das vollständig aggregierende rGNE-Strep-N-Konstrukt nur 25 mU/mg. Die Art und Position der Fusionsteile begünstigen somit unterschiedlich stark die Aggregation bzw. den Zerfall des Epimerase-aktiven Tetramers.

Von dem nativen GNE-Protein aus Rattenlebercytosol wird postuliert, dass das Protein vorwiegend als Hexamer vorliegt (Hinderlich *et al.*, 1997). Tatsächlich konnten in Rahmen dieser Arbeit bei SEC-Experimenten und Aktivitätsanalysen der eluierten Fraktionen sowohl in Ratten- als auch in Mäuselebercytosol eine oligomere Form detektiert werden. Den Aktivitätspeaks zugeordneten Molekulargewichte deuten auch hier auf ein Tetramer hin (siehe 2.2.3.4 und 2.2.3.5). Wie bei allen zuvor beschriebenen Experimenten zur Bestimmung der Quartärstruktur konnte auch beim nativen Protein kein hexamer Protein detektiert werden. Möglicherweise handelt es sich beim als Hexamer beschriebenen höher oligomeren Zustand tatsächlich um ein Tetramer, welches im Laufe der Gelfiltration teilweise aggregiert und daher etwas früher eluiert wird.

Die Tatsache, dass bei der erstmaligen Charakterisierung des gereinigten GNE-Proteins Hexamere beschrieben wurden, führte wohl dazu, dass neue Daten, die gegen ein Hexamer sprachen, an die alten Daten angepasst wurden, um der Diskussion um den oligomeren

Zustand der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu entgehen. Noguchi *et al.* (2004) hatten z.B. mittels Cross-Linking-Experimenten für rekombinante Proteine des UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Wildtyps und einer Reihe von HIBM-Mutanten, die jeweils mit einem 25 kDa-großen Protein fusioniert waren, Partikelgrößen von etwa 100, 200 und 400 kDa detektiert und sie als Monomer, Trimer und Hexamer gedeutet, obwohl eine Stöchiometrie von Monomer, Dimer und Tetramer zur Beschreibung der publizierten Daten schlüssiger wäre. Quantitativ machen Tetramere rund 20% aller oligomeren Proteine aus (Mei *et al.*, 2005), während Hexamere, die aus drei Dimeren bestehen, nur sehr selten beobachtet wurden (Traut, 1994; Dong *et al.*, 1995). Auch die Bildung von einem Hexamer aus zwei Trimeren, wie sie bereits vor Noguchi *et al.* (2004) schon bei Punktmutanten bzw. Deletionsmutanten des rGNE-Proteins (Effertz *et al.*, 1999; Blume *et al.*, 2004) beschrieben wurde, ist ebenfalls sehr selten und daher eher unwahrscheinlich. Die Tatsache, dass die zwei beobachteten Populationen (Trimer und Hexamer), sich in ihrer Größe um den Faktor 2 unterscheiden ($2 \times MW_{\text{Trimer}} = MW_{\text{Hexamer}}$), ist auch gegeben, wenn statt Trimere und Hexamere Dimere und Tetramere angenommen würden. Demnach assoziiert das rGNE-Protein als ein Dimer von zwei Dimeren, worauf bereits das favorisierte Gleichgewichtsmodell (Monomer-Dimer-Tetramer-N_{HET}-Assoziation) der AUZ-Experimente hindeutet.

Yeast-Two-Hybrid-Experimente mit verschiedenen Fragmenten des rGNE-Proteins deuten für die Bildung von Dimeren auf eine primäre Beteiligung der ManNAc-Kinase-Domäne hin (Blume *et al.*, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit exprimierte und gereinigte ManNAc-Kinase-Domäne bestätigt die ausschließlich dimere Struktur der Kinase (siehe 3.4). Eine explizit von der ManNAc-Kinase-Domäne bestimmte tetramere Struktur des Gesamtproteins ist dagegen unwahrscheinlich. Eine genauere Lokalisation der Dimerisierungsstelle auf der ManNAc-Kinase-Domäne lässt sich durch die Charakterisierung von Punktmutanten bestimmen. So bildet die HIBM-Mutante G576E Dimere, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität besitzen (Penner *et al.*, 2006), was bedeuten könnte, dass die Dimerisierung über die ManNAc-Kinase-Domäne bei dieser Mutante gestört ist.

Studien an Deletionsmutanten des rGNE-Proteins zeigten, dass der N-terminale Bereich der ManNAc-Kinase-Domäne (die Aminosäuren im Bereich von 410-596) für die Bildung des höher oligomeren Zustandes ausschlaggebend ist (Blume *et al.*, 2004). Geht man davon aus, dass die postulierten Trimere des Deletionsmutanten $\Delta 490-722$ eigentlich Dimere sind, kann auch die detektierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität dieser Mutanten und der G576E-Punktmutante erklärt werden: Diese Dimere besitzen weiterhin UDP-GlcNAc-2-Epimerase-

Aktivität, weil sie nicht wie bei den nativen Wildtyp-Dimeren über die ManNAc-Kinase-Domäne dimerisieren. Die Assoziation zweier Monomere über die zweite Dimerisierungsstelle ist offensichtlich für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität essentiell, da Epimerase-aktive Monomere bisher nicht detektiert werden konnten. Die kleinste funktionelle Einheit für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität ist ein Dimer mit einer Dimerisierungsstelle in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne. Da die Interaktion zwischen den Kinase-Domänen wesentlich stärker als die über die zweite Dimerisierungsstelle vermittelte Assoziation ist, werden Epimerase-aktive Dimere erst detektiert, wenn die Bindungsstelle der ManNAc-Kinase-Domäne mutiert bzw. deletiert wird. Das Wildtyp-rGNE-Protein besitzt also nur als Tetramer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität, da aus Epimerase-aktiven Dimeren aufgrund der stark dominierenden ManNAc-Kinase-Dimerisierungsstelle Tetramere gebildet werden. Über ihre Lokalisation wurde bisher nur spekuliert, aus den Deletionsmutanten-Analysen wurde eine zweite Dimerisierungsstelle zwischen den Aminosäuren 360 bis 382 postuliert (Blume *et al.*, 2004). Zumindest die Beteiligung der Aminosäure Asp378 kann ausgeschlossen werden, da die HIBM-Mutante D378Y auch im tetrameren Zustand vorliegt (Noguchi *et al.*, 2004) und UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität besitzt (Penner *et al.*, 2006).

Von der *E. coli* UDP-GlcNAc-2-Epimerase, die homolog zu der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des GNE-Proteins ist, ist bekannt, dass sie ebenfalls Dimere bildet. Die Dimerisierungsstelle der *E. coli* UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist aus der Kristallstruktur des Proteins ersichtlich und auf den α -Helices $\alpha 3$ - $\alpha 6$ lokalisiert (PDB-Code 1F6D; Campbell *et al.*, 2000). Auch die kürzlich kristallisierten UDP-GlcNAc-2-Epimerasen vom Archaeobakterium *Thermus thermophilus* Hb8 und dem Bakterium *Bacillus subtilis* (PDB-Code 1V4V bzw. 1O6C) assoziieren über die α -Helices $\alpha 3$ - $\alpha 6$ zum Dimer (Abbildung 3.1).

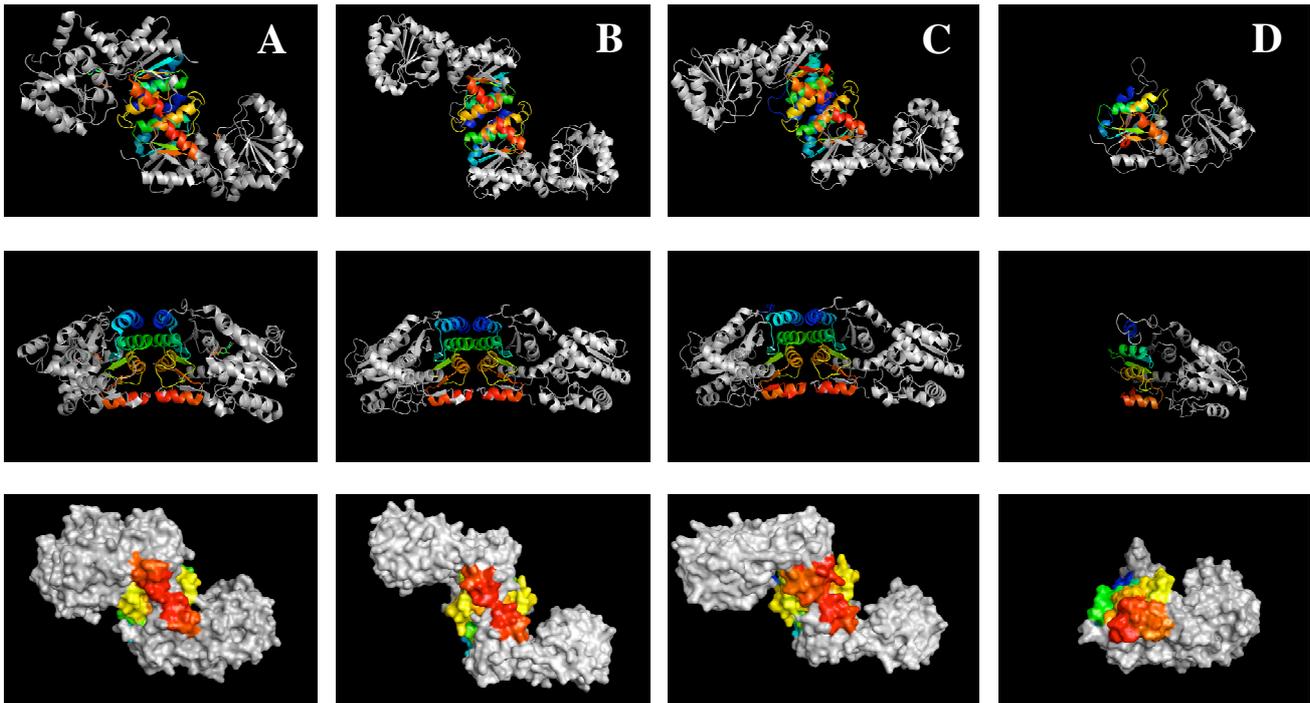


Abbildung 3.1: Struktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* (A), *Thermus thermophilus* (B), *Bacillus subtilis* (C) und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des humanen GNE-Proteins (D). A, B und C basieren auf Kristallstrukturen der beiden Epimerasen. D ist ein Strukturmodell der monomeren humanen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne (Penner *et al.*, 2006). Oben und in der Mitte ist die Sekundärstruktur aus verschiedenen Perspektiven und unten die Proteinoberfläche der UDP-GlcNAc-2-Epimerasen dargestellt. Die α -Helices α 3- α 6 sind farblich hervorgehoben (α 3: blau; α 4: grün; α 5: gelb; α 6: rot).

Auf eine homologe Bindungsstelle beim rGNE-Protein (Aminosäuren 83-171) deuten die beobachteten „Dimere“ der Punktmutanten H110A, D112N, H132A, E134Q, H155A und H157A hin (Effertz *et al.*, 1999; siehe auch 3.3). Weiterhin weist dieser Proteinabschnitt im Vergleich zum restlichen Enzym eine stärkere Konservierung der Aminosäuresequenz auf. Im Bereich der Aminosäuren 72 bis 157 zeigen sich bei den bisher publizierten GNE-Proteinsequenzen von Säugetieren und Vögeln (Mensch, Schimpanse, Ratte, Maus, Hamster, Hund, Huhn) keinerlei Sequenzunterschiede. Im Vergleich zu Fischen sind acht unterschiedliche Aminosäuren (L99I, Q100N, K103Q/H/A, M107L, I108V, S120A, I133V/L, T151S) festzustellen, von denen sechs lediglich ein Austausch von verschiedenen Aminosäuren mit vergleichbaren Eigenschaften präsentieren (Val, Leu, Ile und Met sind aliphatisch; Gln, Asn, Thr und Ser sind neutral), die sich daher wahrscheinlich nicht auf die Struktur und Funktion des rGNE-Enzyms auswirken. Die Relevanz einer bestimmten Aminosäure für die Funktionalität eines Proteins lässt sich aus der Evolution des Proteins und damit aus ihrer Variabilität innerhalb homologer Proteinsequenzen verschiedener Arten ergründen. Vergleicht man z.B. den Grad der Konservierung der bakteriellen UDP-GlcNAc-72

2-Epimerasen mit ihrer Position im Protein, so ergibt sich ein klares Bild: Aminosäuren, die den tiefen Spalt zwischen den beiden „Rossmann-Dinucleotide-Binding-Fold“-Domänen mit dem aktiven Zentrum der Epimerase formen, sind stark konserviert, während Aminosäuren an der Proteinperipherie häufig stark variabel sind und damit für die Funktionalität des Proteins nicht entscheidend sind (Abbildung 3.2 A). Konservierte Aminosäuren finden sich sowohl bei der bakteriellen als auch bei der Epimerase-Domäne von *Deuterostomia* häufiger auf der N-terminalen Subdomäne der UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Aminosäuren 1-180).

Weiterhin ist hervorzuheben, dass die Bereiche der α -Helices $\alpha 9$, $\alpha 10$ und $\alpha 16$ (Aminosäuren 230-246, 260-267 bzw. 366-376) der C-terminalen Subdomäne auf der der Oberfläche zugewandten Seite konserviert sind, während bei bakteriellen Epimerasen dieser Bereich höchst variabel ist (Abbildung 3.2, B). Für diesen Bereich wird die CMP-Neu5Ac-Bindestelle postuliert (Yarema *et al.*, 2001), die durch die Feedback-Inhibition die Aktivität des Enzyms entscheidend reguliert. Für Bakterien sind solche Feedback-Inhibitionen, auch durch andere Substrate, nicht bekannt. Weiterhin ist der bei UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Proteinen hinzugekommene Loop (Aminosäuren 70-77) streng konserviert. Er befindet sich innerhalb der postulierten Dimerisierungsregion des GNE-Proteins und könnte demnach ein Teil dieser sein. Eine zur bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase homologe Dimerisierungsstelle ist zwar nahe liegend, muss aber nicht zwingend vorliegen. So zeigen z. B. die Kristallstrukturen von homologen Kinasen, die als Dimere vorkommen, nicht homologe Dimerisierungsstellen (M. Berger, persönliche Mitteilung).

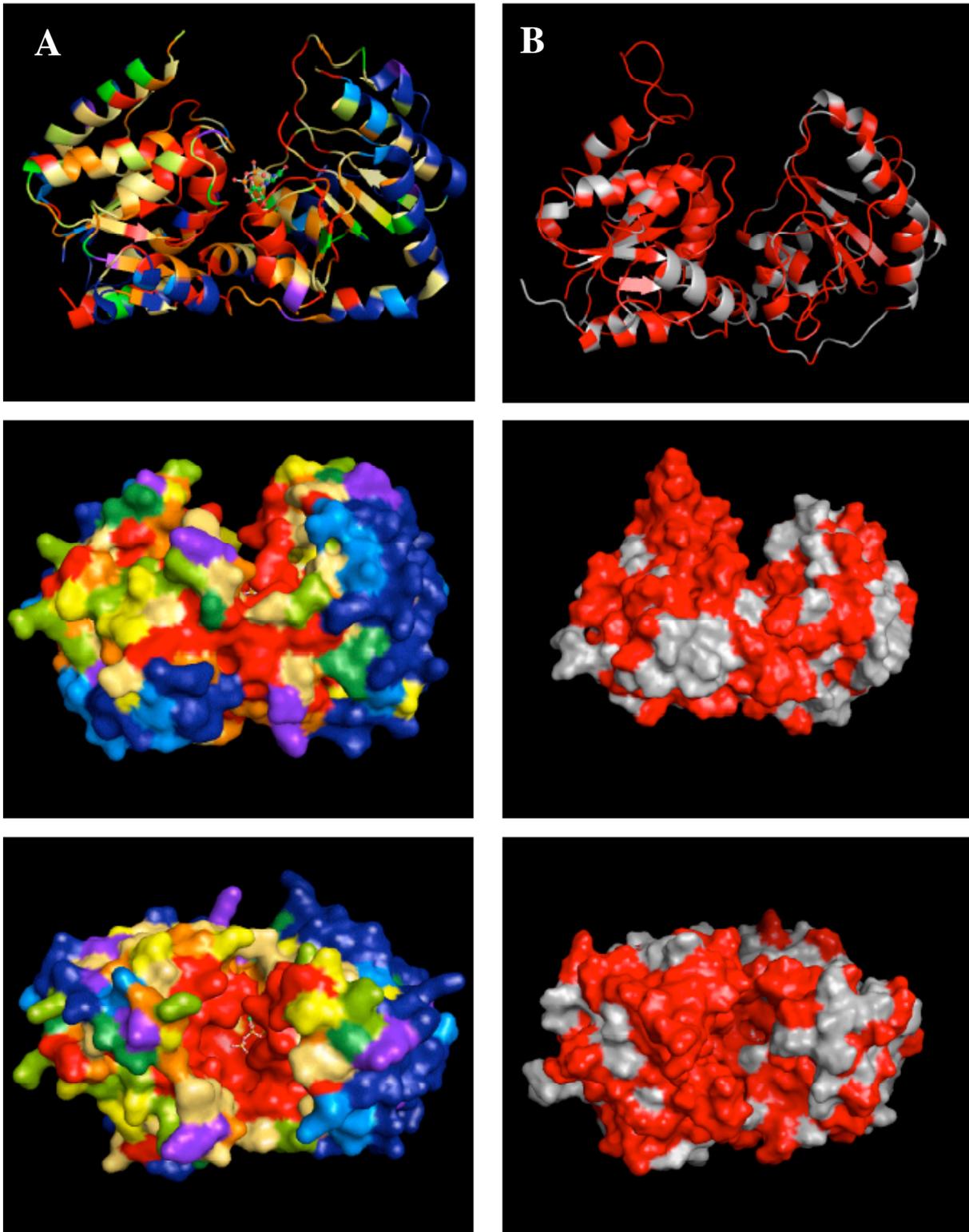


Abbildung 3.2: Konservierte Bereiche der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen (A) und der GNE-Proteine von Deuterostomia (B). Als Basisstruktur zur Veranschaulichung der konservierten Bereiche dient die Kristallstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* (A) bzw. die Modellstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des humanen GNE-Proteins (Penner *et al.*, 2006). Oben ist die Sekundärstruktur und in der Mitte bzw. unten ist die Proteinoberfläche der UDP-GlcNAc-2-Epimerasen dargestellt. A: Der Grad der Aminosäurekonservierung wurde mit der PDBsum-Software von EBI-EMBO bestimmt und ist in zehn Schritten unterteilt (schwache Konservierung: dunkelblau < blau < hellblau < grün < gelbgrün < gelb < gelborange < orange < pink < rot: starke Konservierung). B: Die streng konservierten Bereiche basieren auf der Proteinsequenz der GNE-Proteine von Mensch, Schimpanse, Ratte, Maus, Hamster, Hund, Huhn, Kugelfisch, Zebrafisch, *Tetraodon nigroviridis* (Knochenfisch) und *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel), die homolog zum GNE-Protein sind.

3.2.3 Sekundär- und Tertiärstruktur des rGNE-Wildtyps sowie von HIBM-Mutanten

Patienten, die unter der erblichen Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM) leiden, besitzen Punktmutationen im GNE-Gen, die sowohl die UDP-GlcNAc-2-Epimerase- als auch die ManNAc-Kinase-Domäne betreffen können. Zur Klärung des molekularen Zusammenhangs zwischen den verschiedenen Mutationen im GNE-Protein und der Krankheit wurde u.a. die Enzymaktivität der HIBM-Mutante M712T analysiert. Dabei konnten sowohl in der Aktivität als auch in der Kinetik beider katalytischer Zentren keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Andere HIBM-Mutanten zeigten zwar eine reduzierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und/oder ManNAc-Kinase-Aktivität (Noguchi *et al.*, 2004; Penner *et al.*, 2006), jedoch ergibt sich daraus kein einheitlicher kausaler Zusammenhang zur Myopathie, da auch Mutanten mit Wildtyp-äquivalenten Enzymaktivitäten die Krankheit auslösen können. Auch eine maßgebliche Verantwortung einer stark veränderten Sekundärstruktur der mutierten Proteine erscheint unwahrscheinlich. CD-Spektroskopie-Analysen von insgesamt 7 HIBM-Mutanten (I200F, C303V, D378Y, N519S, F528C, A631Y und M712T; siehe 2.4.1) zeigten lediglich für die N519S-Mutante einen im Vergleich zum Wildtyp (33% α -Helix, 17% β -Faltblatt) wesentlich höheren β -Faltblatt- (31% β -Faltblatt) und einen erniedrigten α -Helix-Anteil (15% α -Helix). Die biometrische Vorhersage der Oberflächen- und Kernaminoacidsäuren zeigen ebenfalls kein einheitliches Bild, so werden den Aminosäuren, die bei HIBM-Patienten mutiert sind, sowohl Positionen auf der Oberfläche als auch weiter im Inneren des Proteins vorhergesagt (Abbildung 2.21, Abbildung 3.3). HIBM-Mutationen sind allerdings auf der Epimerase häufiger auf der Oberfläche, während sie bei der Kinase häufiger im hydrophoben Inneren vorkommen.

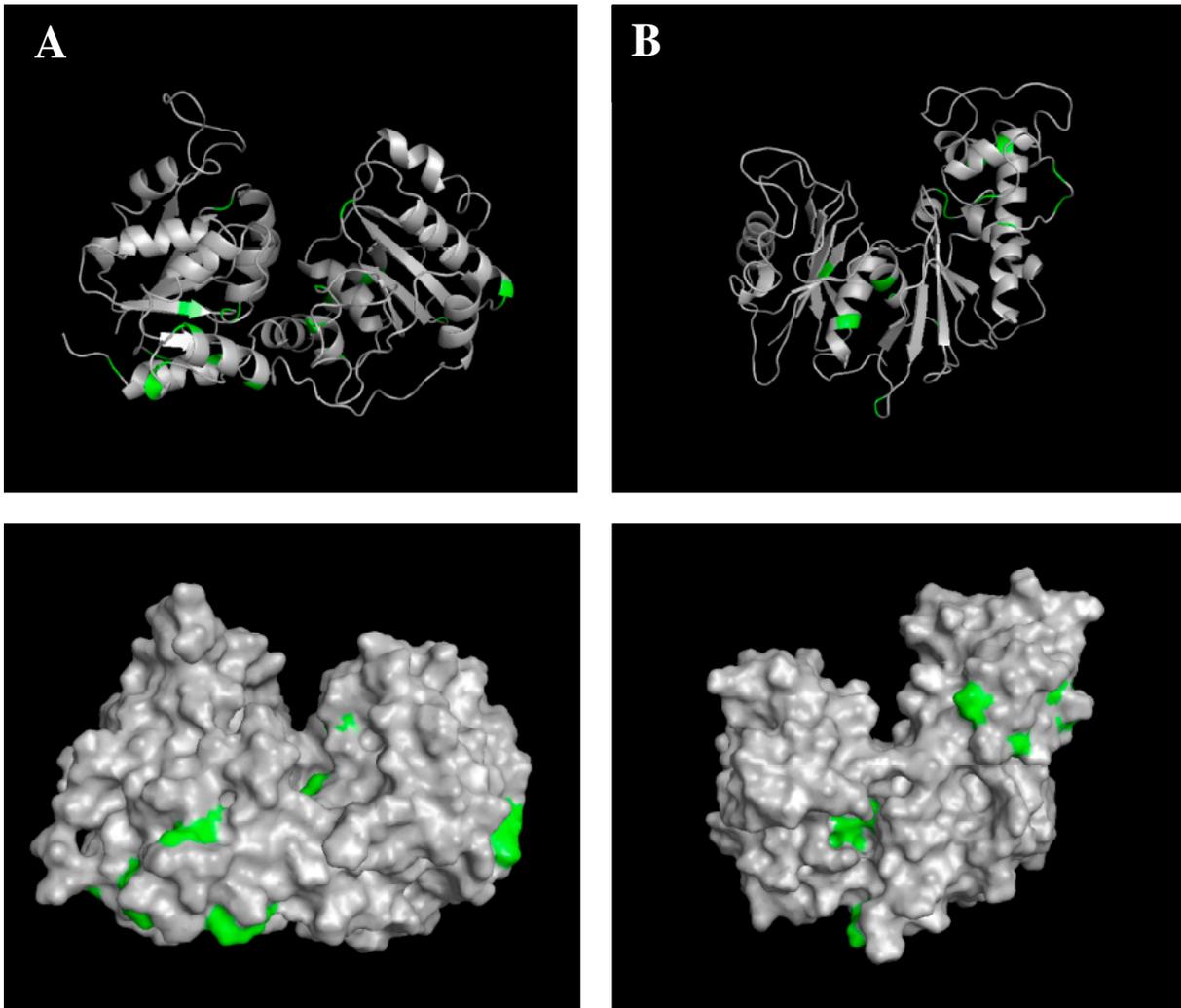


Abbildung 3.3: HIBM-Mutationen in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase- (A) und der ManNAc-Kinase-Domäne (B) des humanen GNE-Proteins. Aminosäuren, die eine der bekannten HIBM-Mutationen tragen können, sind grün hervorgehoben. Zur Darstellung der HIBM-Mutationen dient das Strukturmodell des humanen GNE-Proteins (Penner *et al.*; 2006). Oben ist die Sekundärstruktur und unten ist die Proteinoberfläche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Domäne dargestellt.

Bei allen HIBM-Patienten wird unabhängig von der Mutationsart und -position derselbe Krankheitsphänotyp ausgebildet, jedoch können sich der Beginn, Verlauf und die Stärke der Krankheit stark unterscheiden. Weiterhin sind zwar in Zellen von HIBM-Patienten Änderungen des Sialylierungsgrads beschrieben worden, jedoch weisen nicht alle Individuen ein solches Sialylierungsmuster auf (Salama *et al.*, 2005). Die primäre Ursache der erblichen Einschlusskörperchenmyopathie ist damit weiterhin ungeklärt.

3.3 Analyse des postulierten katalytischen Zentrums der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne von rGNE

Zur Funktionsuntersuchung von 5 potentiellen Aminosäuren der postulierten Substratbindungstasche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne wurden die Punktmutanten K24A, D112N, E134Q, D143N und H220N generiert. Die Vorhersage dieser Aminosäuren basiert auf der Kristallstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli*, welches mit UDP kokristallisiert wurde. Alle 5 Aminosäuren sind stark konserviert und in der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase in direkter Nähe zum Substrat lokalisiert.

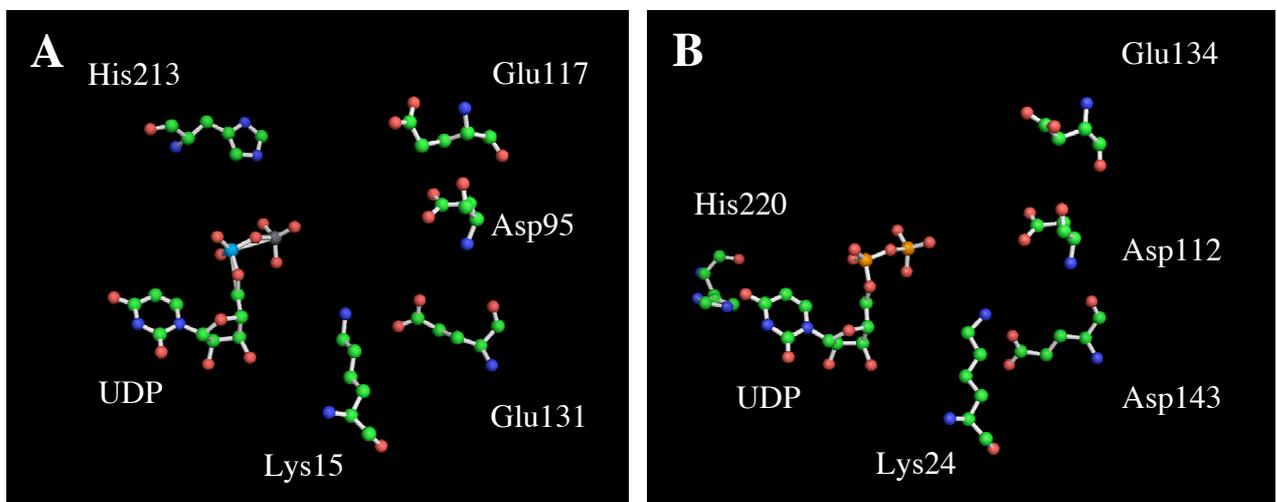


Abbildung 3.4: Substratbindungstasche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* (A) und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des humanen GNE-Proteins (B). Die Abbildungen basieren auf der Kristallstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* (A) bzw. der Modellstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des humanen GNE-Proteins (Penner *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die genannten Punktmutanten charakterisiert. Dabei konnte die essentielle Rolle der carboxylierten Aminosäuren Asp112, Glu134 und Asp143 für die Epimeraseaktivität gezeigt werden, da Punktmutationen der jeweiligen Aminosäure in einem Totalverlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität resultieren. Zumindest für Mutationen der Aminosäuren Asp112 und Glu134 kann die fehlende UDP-GlcNAc-2-Epimeraseaktivität mit dem Fehlen des tetrameren Zustands erklärt werden. Bereits in den AUZ-Experimenten (siehe 3.2) konnte die elementare Rolle der Substrat- bzw. Inhibitorbindung für die Stabilisierung des UDP-GlcNAc-2-Epimerase-aktiven Tetramers dargelegt werden. Wahrscheinlich ist bei den Punktmutanten D112N und E134Q die Bindung des stabilisierenden UDP-GlcNAc bzw. UDP nicht mehr möglich, was in einem Verlust des

tetrameren Zustands führt. Auch Lys24 scheint für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von großer Bedeutung zu sein, da die Punktmutante K24A 90% seiner UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität verliert. Für die Reduktion der Aktivität bei der Punktmutante K24A ist u.a. die verringerte Bindungsaffinität zum Substrat UDP-GlcNAc verantwortlich, die sich aus dem K_M -Wert erschließen lässt, der für die Punktmutante K24A im Vergleich zum Wildtyp um etwa 60% erhöht ist. Weiterhin wurde für K24A neben dem tetrameren Zustand auch das Dimer detektiert, was wie bei den Punktmutanten D112N und E134Q die Reduktion der Epimeraseaktivität erklärt. Die Aminosäuren His220 wie auch die carboxylierten Aminosäuren Asp112, Glu134 und Asp143 könnten als reaktive Base direkt in den enzymatischen Reaktionsmechanismus der Epimerisierung beteiligt sein. Solch eine Base begünstigt die Abstraktion des Protons am C2, mit der die aus *anti*-Elimination (von UDP und des nicht-aziden C2-Protons) und *syn*-Addition (von Wasser zu ManNAc) bestehende Epimerisierung beginnt (siehe Abbildung 1.5). Hinweise für eine Beteiligung der Aminosäure His220 ergaben sich aus der Kristallstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli*, bei der die homologe Aminosäure His213 in direkter räumlicher Nähe zum kokristallisierten UDP lokalisiert ist (Campbell *et al.*, 2000). Aktivitäts- und Enzymkinetik-Analysen der H220N-Punktmutante zeigten zum Wildtyp eine um etwa 50% reduzierte Epimeraseaktivität und eine Erhöhung des K_M -Wertes um etwa 40%. Offensichtlich spielt His220 für die Bindung von UDP-GlcNAc eine tragende Rolle, was die reduzierte Epimerase-Aktivität teilweise erklärt. Da jedoch kein Totalverlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität beobachtet wurde, kann die Aminosäure His220 für die Epimerisierung im bifunktionellem Protein nicht essentiell sein. Auch im Strukturmodell der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne des humanen GNE-Proteins (Penner *et al.*, 2006) ist die Position von His220 zum UDP deutlich verschoben und der Abstand zueinander vergrößert (Abbildung 3.4). Aktivitätsanalysen anderer Histidin-Punktmutanten innerhalb der UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Effertz *et al.*, 1999) zeigten einen Totalverlust der Epimeraseaktivität, der anscheinend durch den Zerfall des tetrameren Zustands verursacht wird. Für His220-Punktmutanten wurde dagegen ein solcher Zerfall der Tetramere nicht beobachtet.

In einer vergleichbaren Studie wurden die homologen Aminosäuren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* mutiert (Murkin *et al.*, 2004). Mutationen der carboxylierten Aminosäuren Asp95, Glu117 und Glu131 (homolog zu Asp112, Glu134 und Asp143 des rGNE-Proteins) zeigten einen nahezu kompletten Verlust der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Mutationen der basischen Aminosäuren Lys15 und His213 (homolog zu Lys24 und His220 des rGNE-Proteins) wiesen eine um über 98% reduzierte Epimerase-Aktivität auf, die

sich mit der beobachteten drastischen Erhöhung des jeweiligen K_M -Wertes sowie mit einer erhöhten Freisetzung der Reaktionsintermediats UDP erklären lassen. Diese Ergebnisse deuten an, dass wahrscheinlich die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Aminosäuren Lys24 und His220 eher an der Substratbindung als an den katalytischen Reaktionsmechanismus beteiligt sind. Zwar beeinflussen die eingeführten Punktmutationen in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne dessen Epimerase-Aktivität, jedoch ist die ManNAc-Kinase-Aktivität der Punktmutanten zum Wildtyp nicht signifikant verändert (Abbildung 2.19). Offensichtlich ist die Aktivität der ManNAc-Kinase-Domäne unabhängig von der N-terminalen Epimerase-Domäne, was auch in früheren Arbeiten beobachtet wurde (Effertz *et al.*, 1999).

Um einen besseren Einblick in die Funktionsweise der mutierten Aminosäuren zu erhalten, wurden enzymkinetische Daten der Mutanten bestimmt. Das rekombinante Wildtypenzym besitzt für UDP-GlcNAc einen K_M -Wert von 75 μM , der damit gegenüber dem nativen GNE-Protein, welches aus Rattenleber isoliert wurde, um den Faktor 4 höher ist. Ursache hierfür könnte der His₆-Fusionsteil des rekombinanten rGNE-Proteins sein, der die Bindungsaffinität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne beeinflusst. Für die Bindung von UDP-GlcNAc an die Punktmutanten D112N, E134Q und D143N konnten keine kinetischen Konstanten bestimmt werden, da für diese keine Epimerase-Aktivitäten detektierbar waren. Dagegen waren die UDP-GlcNAc- K_M -Werte für K24A und H220N gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht, was auf eine reduzierte Bindungsaffinität hinweist. Diese Reduktion erklärt auch teilweise die verringerte UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität. Für das rekombinant exprimierte Wildtyp-rGNE-Protein konnten K_M -Werte der ManNAc-Kinase-Substrate ManNAc und ATP von 60 μM und 2 mM ermittelt werden, die sich damit im Bereich der zuvor bestimmten Werte des nativen rGNE-Proteins bewegen (Hinderlich *et al.*, 1997). Interessanterweise sind die ATP- K_M -Werte für die Punktmutanten D112N und E134Q, die um etwa den Faktor 2 reduziert waren. Die Daten legen nahe, dass diese Mutationen in der Epimerase-Domäne zwar nicht die Aktivität aber anscheinend die Struktur und so auch die Bindungsaffinitäten der Kinase-Domäne beeinflussen.

Untersuchungen der oligomeren Struktur mittels Gelfiltration zeigten bei den rekombinant exprimierten Punktmutanten D143N und H220N den für den Wildtyp typischen Tetramerpeak. Auch für K24A konnte neben dem dimeren Zustand Tetramere detektiert werden. Im Gegensatz dazu fehlt die tetramere Quartärstruktur bei den Mutanten D112N und E134Q, was in deren UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Inaktivität resultiert. In der Kristallstruktur der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von *E. coli* ist ersichtlich, dass die Bindung des

kokristallisierten UDP durch die konservierten Aminosäuren Arg10 und Phe276 stabilisiert wird (Campbell *et al.*, 2000). Insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren Asp112, Glu134 und Asp143 dagegen befinden sich in dem Bereich, wo die Bindung des GlcNAc-Anteils des Substrates UDP-GlcNAc postuliert wird. Da STD-NMR-Analysen nahelegen, dass die Bindung des Substrates UDP-GlcNAc primär über den Uridin-Anteil erfolgt (Blume *et al.*, 2004), sollten diese mutierten Aminosäuren weniger für die Substratbindung sondern vielmehr den enzymatischen Reaktionsmechanismus beeinflussen. Tatsächlich zeigten die Punktmutanten eher veränderte Bindungsaffinitäten und zumindest bei den Mutanten D112N und E134Q einen Verlust des für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität essentiellen tetrameren Zustands. Interessant ist die Tatsache, dass sich die Aminosäuren Asp95 und Glu117 der bakteriellen Epimerase, die homolog zu Asp112 und Glu134 des rGNE-Proteins sind, in der Dimerisierungsstelle der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase ($\alpha 3$ - $\alpha 6$) befinden, die im Vergleich zum Restprotein starke Homologien zum rGNE-Protein aufweist. Auch andere Punktmutanten in dieser Region (His110, His132, His155 und His157) führten zu einem Verlust des höher oligomeren Zustand und der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität (Effertz *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der Punktmutantenanalyse legen damit eine ähnliche Dimerisierungsstelle im rGNE-Protein nahe. Eine Beeinflussung der Bindungsaffinitäten für das Substrat UDP-GlcNAc kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da keine K_M -Werte für D112N und E134Q bestimmt werden konnten, die darüber Aufschluss geben würden.

3.4 Charakterisierung und Kristallisation der ManNAc-Kinase-Domäne

Da die gereinigte rGNE-Proteinlösung nicht monomodal war und zudem noch einem komplexen Gleichgewichtssystem unterworfen ist, gelang die Kristallisation des Gesamtproteins nicht. Gegen eine Kristallisation sprachen auch die in NMR-Untersuchungen beobachtete flexible „Wobble“-Struktur des Proteins, die sonst charakteristisch für Glycoproteine ist, deren Zuckerstrukturen sich in Lösung bewegen (A. Blume, persönliche Mitteilung). Des Weiteren enthielt das rGNE-Protein im Vergleich zu anderen Proteinen eine etwa zehnfach höhere Einlagerung von Wassermolekülen, was ebenfalls eine Kristallisation erschwert.

Alternativ zum Gesamtprotein wurden die beiden Domänen separat exprimiert. Die UDP-

GlcNAc-2-Epimerase-Domäne war unter allen getesteten Expressionsbedingungen sowohl mit einem GST- als auch mit einem MBP-Fusionsteil nicht löslich und war daher nicht zu reinigen. Als mögliche Ursache könnten Faltungsfehler bei der Expression in Frage kommen. Möglich wäre auch, dass hydrophobe Aminosäuren der Epimerasedomäne, die sonst im Gesamt-rGNE-Protein im Proteinkern vorliegen, nun aufgrund des Fehlens der Kinasedomäne oberflächlich auftreten und so die Löslichkeit des rekombinanten Proteins verringern.

Die separat exprimierte ManNAc-Kinase der Ratte war dagegen löslich; mit einem GST-Fusionsteil konnte die Kinase isoliert und der GST-Anteil anschließend erfolgreich abgetrennt werden. Die gereinigte ManNAc-Kinase-Proteinlösung war monomodal, was für eine Kristallisation essentiell ist. Tatsächlich konnten erste ManNAc-Kinase-Kristalle gezüchtet werden, die jedoch bisher noch nicht die benötigten Brechungseigenschaften für eine Strukturaufklärung besitzen. Die ManNAc-Kinase-Domäne liegt wie die meisten anderen Zuckerkinasen als Dimer vor (Abbildung 2.24) und besitzt als Dimer ein berechnetes natives Molekulargewicht von 68,4 kDa. Interessant ist die hohe spezifische Enzymaktivität der gereinigten Kinase-Domäne von 13 U/mg, während für das rGNE-Protein lediglich eine spezifische ManNAc-Kinase-Aktivität von 1,8 U/mg (Abbildung 2.19) ermittelt wurde. Wahrscheinlich erscheint, dass im Gesamtprotein die ManNAc-Bindestelle der ManNAc-Kinase-Domäne durch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne sterisch behindert ist. Der evolutionäre Vorteil einer sterischen Blockade der ManNAc-Kinase lässt sich aus dem postulierten Grund der Bifunktionalität des Gesamtproteins erklären. So wird eine Freisetzung des im ersten Schritt synthetisierten ManNAc-Moleküls ins Cytosol verhindert, wo es mittels der GlcNAc-2-Epimerase den katabolen Neu5Ac-Stoffwechsel (siehe 1.3.2) zugeführt würde. Die verhinderte Freisetzung von ManNAc ins Cytosol beim rGNE-Protein resultiert im Gegenzug auch in einer reduzierten Zugänglichkeit der ManNAc-Bindestelle für exogenes ManNAc, was sich in der reduzierten ManNAc-Kinase-Aktivität des Gesamtproteins bei Enzymassays widerspiegelt. Diese Reduktion der Aktivität kann im Gesamtprotein verkraftet werden, da die Epimerasereaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Sialinsäurebiosynthese ist. Für die Übertragung des ManNAc-Moleküls von der Epimerase- zur Kinase-Domäne müssten demnach die beiden aktiven Zentren durch einen innermolekularen Tunnel verbunden oder in direkter räumlicher Nähe sein, was jedoch unwahrscheinlich ist, da die Substratbindestellen für UDP-GlcNAc und ManNAc relativ zentral in den jeweiligen Domänen liegen. Die UDP-GlcNAc-Bindestelle der bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase befindet sich innerhalb eines tiefen Spalts zwischen zwei „Rossmann-Dinucleotid-Binding-Fold“-Subdomänen (Campbell *et al.*, 2000). Für das rGNE-Protein kann aufgrund der

Sekundärstrukturvorhersage (Abbildung 2.21) sowie der Punktmutantenanalyse (3.3) eine ähnliche Struktur angenommen werden. Die Substratbindestelle von ROK-Kinasen, zu den auch die ManNAc-Kinase gehört, ist ebenfalls in einem Spalt innerhalb des V-förmigen Proteins lokalisiert. Die spaltartigen Strukturen beider Domänen könnten jedoch andererseits Teil des postulierten Tunnels sein. Für andere bifunktionelle Enzyme, wie die 4-Hydroxy-2-Ketovalerat-Aldolase (DmpG)/Acetaldehyde Dehydrogenase (DmpF) und die Monoxid-Dehydrogenase/Acetyl-Koenzym A-Synthase, die beide bereits kristallisiert wurden, konnten entsprechende Tunnelstrukturen zwischen den beiden aktiven Zentren nachgewiesen werden (Manjasetty *et al.*, 2003; Volbeda *et al.*, 2004).