

1 Einleitung

1.1 Die *UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE)*

Die N-Acetylneuraminsäure (NeuAc) ist die Grundstruktur aller Neuraminsäuren oder Sialinsäuren, von denen nahezu 50 nachgewiesen wurden. Die Biosynthese von NeuAc beginnt mit der irreversiblen Epimerisierung von UDP-*N*-Acetylglukosamin zu *N*-Acetylmannosamin und der anschließenden Phosphorylierung zu *N*-Acetylmannosamin-6-phosphat. Die Existenz der Aktivität der UDP-GlcNAc 2-Epimerase konnte erstmals in der Arbeitsgruppe von S. Roseman nachgewiesen werden (Comb und Roseman, 1958). Zunächst gelang nur die Anreicherung der UDP-GlcNAc 2-Epimerase aus Rattenleber (Sommar und Ellis, 1972; Kikuchi und Tsuiki 1973). Erst 1997 konnten beide Enzymaktivitäten gereinigt und ihre cDNA isoliert werden (Stäsche et al. 1997). Histochemisch konnte schon bald gezeigt werden, dass beide Enzymaktivitäten ein gleiches Verteilungsmuster in verschiedenen Geweben und in subzellulären Strukturen aufwiesen (Van Rinsum, 1983). Beide enzymatischen Aktivitäten sind auf einem Protein lokalisiert. Das bifunktionelle Enzym UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) besteht aus 722 Aminosäuren und ist ca. 72 kDa groß. Sie läßt sich in zwei Domänen aufteilen, wobei N-terminal große Homologien zur prokaryontischen UDP-GlcNAc 2-Epimerase bestehen und die C-terminale Domäne Ähnlichkeiten zur Familie der ROK (Repressor, ORF, Kinase)-Zuckerkinasen besitzt (Abb. 1). Beide Domänen und Aktivitäten lassen sich *in vitro* unabhängig voneinander exprimieren (Effertz et al. 1999).

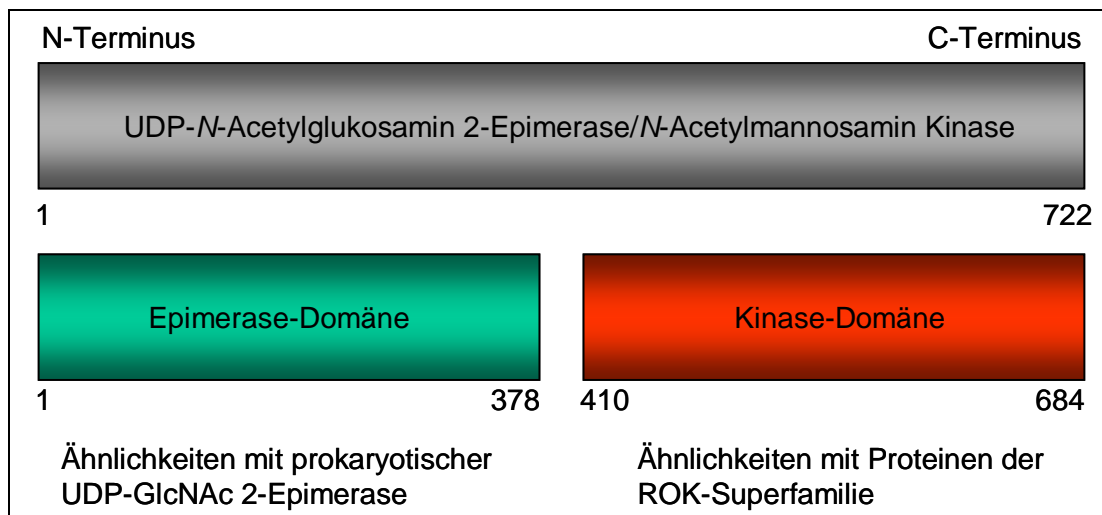


Abbildung 1: Schematische Darstellung der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) und ihrer Domänen.

Die Kristallstruktur der bakteriellen UDP-GlcNAc 2-Epimerase wurde aufgeklärt (Campbell et al. 2000). Bisher gelang es jedoch nicht, die bifunktionelle GNE zu kristallisieren. Das aus der Ratte isolierte Enzym kam in zwei verschiedenen oligomeren Zuständen vor, als Homohexamer und als Homodimer. Erstaunlicherweise weisen beide oligomeren Zustände nicht die gleichen Enzymaktivitäten auf. Das Hexamer besitzt sowohl die Epimerase- als auch die Kinase-Aktivität, wohingegen das Dimer nur Kinase-Aktivität zeigt (Hinderlich et al. 1997). *In vitro*-Untersuchungen mit Punkt- und Deletionsmutanten zeigten auch trimere Zustände des Enzyms (Effertz et al. 1999, Blume et al. 2004). Ein Jahr später zeigte Darius Gadheri in seiner Doktorarbeit mittels Lichtstreuungs- und Ultrazentrifugationsanalysen tetramere und dimere Zustände der GNE. Vermutlich sind diese Unterschiede in der oligomeren Struktur auf die unterschiedlichen Analysemethoden zurückzuführen. Allen Untersuchungen ist jedoch gemein, dass die Dimere nur die Kinase-Aktivität besitzen und höhere oligomere Strukturen zusätzlich auch die Epimerase-Aktivität aufweisen.

Die Klonierung der GNE gelang bisher aus Ratte (Stäsche et al. 1997), Maus (Horstkorte et al. 1999) und Mensch (Lucka et al. 1999). Die Aminosäuresequenzen von Mensch, Maus und Ratte zeigen eine hohe Homologie. Der Unterschied zwischen Mensch und Ratte besteht in 10 Aminosäuren, der zwischen Mensch und Maus in 9 Aminosäuren und die Aminosäuresequenz von Ratte und Maus unterscheiden sich in lediglich einer einzigen Aminosäure. Selbst zu Organismen, die nicht zu den

Säugetieren zählen, ist die Homologie noch sehr hoch (Vögel 90 % und Fische 80 %). Keine Sequenzunterschiede gibt es zu Schimpansen.

1.2 Expressionsmuster und subzelluläre Verteilung der GNE

Die GNE wird in der Maus ist in allen untersuchten Organen exprimiert, in der Leber am stärksten. Während der Entwicklung der Maus wird das Enzym bereits in sehr frühen embryonalen Stadien nachgewiesen. In 15 Tage alten Embryonen konnte durch *in situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass sehr viel GNE in Leber, Lunge und Cerebellum exprimiert wurde (Horstkorte et al. 1999). In der Ratte ist die Expression der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase ebenfalls in sekretierenden Organen wie der Leber, der Speicheldrüse und der Darmschleimhaut am höchsten (Stäsche et al. 1997). Untersuchungen von menschlichen Geweben bestätigten die hohe Expression in der Leber, aber auch in der Placenta (Lucka et al. 1999). Bemerkenswerterweise ist die Expression in menschlicher Skelettmuskulatur entwicklungsabhängig. Während die Expression in unreifen Myoblasten am stärksten ist, nimmt sie in reifen Skelettmuskelzellen ab (Krause et al. 2005).

Die GNE ist ein cytosolisches Protein. Eine neuere Studie belegt eine Co-Lokalisation der GNE mit Markern des Kerns und des Golgi-Apparates (Krause et al. 2005). Die Übertragung von Sialinsäuren auf Glykokonjugate durch Sialyltransferasen findet im Golgi statt, von wo sie zur Plasmamembran transportiert werden. Daher ist die Lokalisation der GNE am bzw. im Golgi physiologisch sinnvoll. Die Lokalisation der GNE am bzw. im Kern legt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym noch eine weitere Rolle, z.B. bei der Transkriptionskontrolle, spielen könnte. Im Gegensatz zu anderen Aminozuckern, deren Aktivierung im Cytosol stattfindet, erfolgt die Aktivierung der Sialinsäuren zu CMP-NeuAc im Kern (Kean, 1970, Munster-Kuhnel et al. 2004).

Es sind verschiedene Spleißvarianten der GNE gefunden worden (Watts et al. 2003, Tomimitsu et al. 2004). Sie unterscheiden sich in ihrer 5'-Aminosäuresequenz und zeigen eine gewebespezifische Verteilung. Watts et al. haben 4 (I-IV) verschiedene Spleißprodukte der GNE für den Menschen beschrieben, wobei die Spleißvariante IV das komplette Open-Reading-Frame (ORF) darstellt (Abb.2). Das Gen der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase kodiert 14 Exons. Das Exon A1 ist erst

kürzlich von Watts et al. beschrieben worden. Bei Variante I wird Exon 1 direkt an Exon 3 gespleißt, wobei bei den Varianten II, III und IV kein Exon 1 vorhanden ist, sondern das Exon A1 entweder direkt an Exon 3 oder an Exon 2 gespleißt wird. Die meisten untersuchten Gewebe exprimieren nur eine der vier Varianten (Leber und Schilddrüse nur Variante III). Wohingegen in Niere und Prostata die Spleißprodukte I, II und IV auch in Kombinationen auftreten. In Plazenta sind II und IV coexprimiert. Die Varianten III und IV konnten bisher nie zusammen in einem Gewebe nachgewiesen werden. Exon 1 und Exon A1 kommen nie zusammen in einem Transkript vor. Alle vier Isoformen unterscheiden sich demnach in ihrer 5' untranslatierten Region.

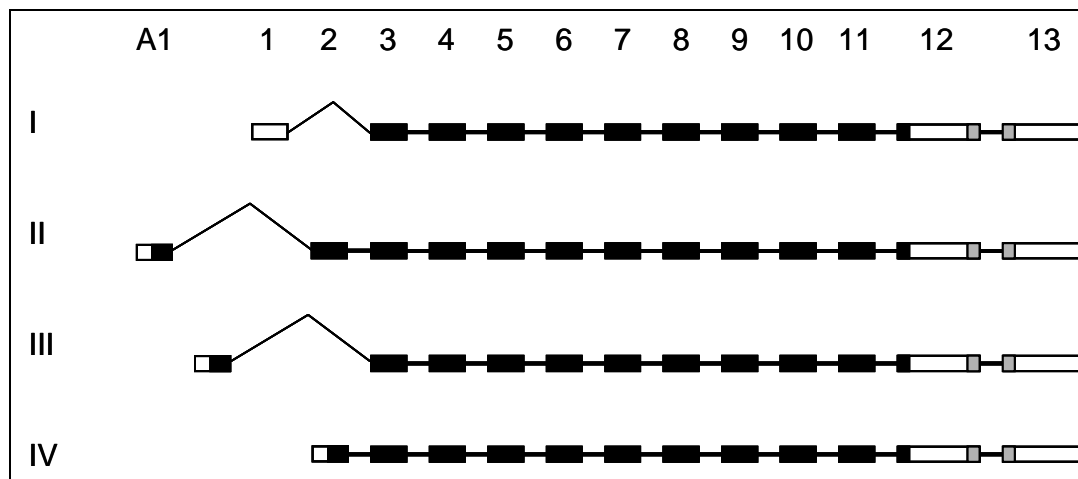


Abbildung 2: Schematische Darstellung der vier Isoformen der GNE. Die nummerierten Kästchen stellen die Exons dar. Schwarze Kästchen sind codierende Regionen. Die verbindenden Linien stellen die Introns dar. Exon 12 enthält ein *AluY* Repeat (grau), was mit einem *AluSx* Repeat (grau) am Anfang des Exons 13 gespleißt wird und als 3' UTR (untranslated Region) transkribiert wird. Exon 1 bzw. Exon A1 werden jeweils als 5' UTR transkribiert. Abbildung nach Watts et al. 2003.

1.3 Regulation der GNE

Über die Regulation der GNE ist noch wenig bekannt. Zum einen wird das Enzym durch Feedback-Inhibierung mit CMP-NeuAc, dem Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, reguliert (Kornfeld et al. 1964, Seppala et al. 1999). Zum anderen wird es durch die Proteinkinase C phosphoryliert, wodurch die UDP-GlcNAc 2-Epimerase-Aktivität erhöht wird (Horstkorte et al. 2000). Die ManNAc Kinase-Aktivität hingegen wird durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst. Diese beiden Regulationsmechanismen zeigen die Schlüsselrolle der GNE bei der Biosynthese der

Sialinsäuren. Wie bereits zu Beginn erwähnt, existiert die GNE in mehreren oligomeren Zuständen, wobei das Tetramer sowohl Epimerase- als auch Kinase-Aktivität aufweist und das Dimer nur die Kinase-Aktivität besitzt. Die Regulation über die oligomeren Zustände des Enzyms erfolgt über das Substrat UDP-GlcNAc, dass das Enzym in den tetrameren Zustand überführt. Eine weitere Möglichkeit der Regulation über die Expression des Enzyms durch DNA-Methylierung wurde ebenfalls beschrieben (Oetke et al. 2003, Giordanengo et al. 2004). Möglicherweise besitzen die Spleißvarianten unterschiedliche Eigenschaften und durch die gewebespezifische Expression dieser Spleißprodukte ist eine Regulation des Enzyms ebenfalls sehr wahrscheinlich.

1.4 Pathologie der GNE

Änderungen in der DNA-Sequenz eines Gens, z.B. durch eine Punktmutation, können zu schweren pathologischen Zuständen führen. Bisher sind zwei Erbkrankheiten bekannt, bei denen das Gen der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (*gne*) mutiert ist, die Sialurie und die erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM).

1.4.1 Sialurie

Die Sialurie ist eine seltene erbliche Stoffwechselkrankheit, die durch eine cytoplasmatische Akkumulation und erhöhte Ausscheidung von freien Sialinsäuren im Urin charakterisiert ist. Die Überproduktion von Sialinsäuren beruht auf einem Defekt der Feedback-Hemmung der UDP-GlcNAc 2-Epimerase durch das Endprodukt CMP-NeuAc. Seppala et al. klärten den molekularen Mechanismus der defekten allosterischen Regulation dieser Krankheit auf, in dem sie die cDNA von Sialurie-Patienten klonierten und sequenzierten und dabei die Mutationen in der UDP-GlcNAc 2-Epimerase bestimmten (Seppala et al. 1999). Drei heterozygote Mutationen, Arg266Trp, Arg266Gln und Arg263Leu lassen vermuten, dass sich die allosterische Stelle der Epimerase in den Regionen der Codons 263 bis 266 befindet. Die heterozygote Natur des mutierten Allels in allen drei Patienten demonstriert den dominanten Erbgang der Sialurie, denn der heterozygote Defekt reicht aus, um diese

Krankheit hervorzurufen. In diesem Falle produziert die mutierte Epimerase ungehemmt freie Sialinsäuren und somit auch CMP-NeuAc, was die normale aber nicht die mutierte Epimerase inhibiert. Und so kommt es zu einem unkontrollierten Anstieg freier Sialinsäuren im Cytoplasma und zur Ausscheidung über den Urin. Sialurie-Patienten zeigen oft geistige Entwicklungsstörungen und besitzen eine vergrößerte Leber (Ferreira et al. 1999, Enns et al. 2001).

1.4.2 Erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM)

Die erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (engl. Hereditary Inclusion Body Myopathy, HIBM) gehört zu einer Gruppe neuromuskulärer Erkrankungen, die durch eine meist erst im Erwachsenenalter beginnende und langsam von distal nach proximal fortschreitende Muskelschwäche charakterisiert ist. Die Muskeln zeigen eine typische Pathologie mit sogenannten „rimmed vacuoles“ und filamentösen Einschlüssen. In den für diese Krankheit charakteristischen Einschlüssen wurden für neurodegenerative Erkrankungen typische Proteine gefunden (Askanas et al. 1998). Es wurden autosomal-dominante und autosomal-rezessive Formen beschrieben. Die autosomal-rezessive Form wurde zuerst in Juden persischer Herkunft entdeckt und ist eine Myopathie, die hauptsächlich die Beinmuskeln befällt und eine ungewöhnliche Verteilung zeigt, wobei der Quadrizeps (großer Oberschenkelmuskel) zunächst nicht betroffen ist. Diese Form der Krankheit wird auch Quadriceps-sparing myopathy (QSM) genannt. Sie wurde später auch in anderen Familien aus dem mittleren Osten und Japan gefunden. Das mutierte Gen wurde auf dem Chromosom 9p13-p12 lokalisiert und in 104 Patienten von 47 Familien aus dem mittleren Osten wurde die gleiche homozygote Mutation im *gne*-Gen gefunden (Eisenberg et al. 2001). In Japan wurden Patienten mit ähnlichem Phänotyp beschrieben, die ebenfalls „rimmed vacuoles“ in den Muskeln besaßen. Diese Myopathy wurde nach ihrem Entdecker Nonaka distal myopathy benannt (Nonaka et al. 1981). In diesen Patienten wurde die gleiche Region auf Chromosom 9 lokalisiert, die für diese autosomal-rezessive Einschlusskörperchenmyopathie verantwortlich ist (Ikeuchi et al. 1997). Bisher sind über 40 Mutationen in der GNE gefunden worden. Diese Mutationen verteilen sich über das gesamte Protein. In einigen Patienten wurde die Enzymaktivität der GNE untersucht und es stellte sich heraus, dass die Epimerase-Aktivität in diesen Patienten

verringert war (Noguchi et al. 2004). Auch *in vitro* Untersuchungen von rekombinant exprimierten HIBM-Mutanten der GNE zeigten verringerte Epimerase-Aktivitäten (Hinderlich et al 2004). Ob die Krankheit auf eine geringere Oberflächensialylierung der Zellen in den Geweben der Patienten zurückzuführen ist, oder ob andere Mechanismen Ursache für die Krankheit sind, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine geringere Sialylierung des α -Dystroglykans zur gestörten Interaktion mit der extrazellulären Matrix führt und dies der Pathomechanismus der HIBM ist (Huizing et al. 2004). Das α -Dystroglykan ist ein zentrales Protein des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes von Skelettmuskelzellen und verbindet über Dystrophin das Cytoskelett mit der extrazellulären Matrix.

1.5 Die Entwicklung der Maus und die Bedeutung der GNE für die Embryogenese

Die embryonale Entwicklung der Maus kann man in vier Stadien gliedern. Das Präimplantationsstadium (0.-5. Tag) stellt den ersten Abschnitt dar, der mit der Befruchtung der Eizelle beginnt und mit der Implantation des Embryos endet. In dieser Phase bildet sich die sogenannte Blastocyste. Sie besteht aus dem äußeren Trophektoderm und einer inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM). Während der sogenannten Kompaktion lagern sich die zunächst noch distinkt verteilten Zellen zur ICM zusammen. Aus dem Trophektoderm werden später extraembryonale Strukturen, und die ICM erzeugt Embryonalgewebe. In der zweiten Phase der Mausentwicklung (5.-10. Tag) erfolgt die Implantation des Embryos, Gastrulation und die Neurogenese. Nach der Implantation proliferiert die ICM der Blastocyste stark und es entsteht ein „Eizylinder“. In der Folge differenziert sich dieser „Eizylinder“ und es entsteht der Primitivstreifen. Während der Gastrulation wandern Zellen aus dem Ektoderm durch den Primitivstreifen und bilden dann das Mesoderm. Im Anschluß an die Gastrulation erfolgt die Neurulation, bei der die Grundzüge des Nervensystems angelegt werden. Spezifisch für Nagetiere ist die sogenannte Inversion der Keimblätter („turning“), bei der die vormals äußeren Schichten nach innen und die zuvor inneren Schichten nach außen gekehrt werden, so dass die innere Schicht des „Eizylinders“ aus ehemaligen Ektodermzellen besteht und die äußere Schicht aus ehemaligen Endodermzellen.

Diese Umkehrung der Keimblätter findet man bei anderen Chordaten nicht. Die dritte Phase stellt das Organogenese-Stadium (bis 14. Tag) dar, in dem die einzelnen Organe gebildet werden. In der darauffolgenden vierten Phase, dem fetalen Wachstumsstadium, sind die meisten Strukturen voll ausgebildet und die vorgeformten Gewebe wachsen weiter. Am 20. Tag erfolgt dann die Geburt der Mäuse.

Die Expression der GNE ist während der gesamten Embryonalentwicklung nachweisbar. Die mRNA des Enzyms konnte in Embryonen von Embryonaltag E7 bis zum E17 nachgewiesen werden. Und eine entwicklungsabhängige Regulation auf RNA-Ebene wurde nicht gefunden. Auch embryonale Stammzellen, die aus Blastocysten, die an Tag E3,5 isoliert wurden, besitzen GNE-Expression. Homozygot (-/-) GNE-defiziente Mäuse (KO-Mäuse) sind embryonal lethal, dagegen sind heterozygote (-/+) Mäuse, bei denen ein Allel ein funktionsfähiges *gne*-Gen besitzt, überlebensfähig und zeigen auch später keine phänotypischen Veränderungen (Schwarzkopf et al. 2002). Die KO-Mäuse sterben an E8,5. Leider konnte keine Schlußfolgerung gemacht werden, ob sich die Embryonen bis Tag E8,5 entwickelten und dann resorbiert wurden oder ob die Blastocysten schon an E3,5 abstarben. Es ist gut möglich, dass die maternale RNA ausreicht, damit sich der Embryo bis E8,5 entwickelt. Die überlebensfähigen heterozygoten Mäuse besitzen eine um die Hälfte verringerte Enzymaktivität der GNE, wobei diese verringerte Enzymaktivität keinen Einfluß auf die Entwicklung der Mäuse zu haben scheint, da diese völlig normal entwickelt waren. Embryonale Stammzellen, die GNE-defizient sind, können in Zellkultur überleben und nehmen fehlende Sialinsäuren über das Serum des Mediums auf und bauen diese in ihre Oberflächenglykoproteine ein (Schwarzkopf et al. 2002). Es ist durchaus möglich, dass die Embryonen über die Placenta ausreichend mit Sialinsäuren versorgt werden, so dass der Defekt dieser Mäuse nicht unbedingt durch das Fehlen von Sialinsäuren zu begründen ist, sondern die GNE selbst noch eine weitere Rolle außer der Sialinsäurebiosynthese bei der Entwicklung spielt.

1.6 Die Biosynthese von Sialinsäuren und ihre Strukturvielfalt

Wie bereits eingangs erwähnt ist die GNE das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese und katalysiert die Epimerisierung von UDP-N-

Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und anschließend die Phosphorylierung zu *N*-Acetylmannosamin-6-phosphat (ManNAc-6-P). In mehreren enzymatischen Schritten entsteht *N*-Acetylneuraminsäure (NeuAc), die in den Kern transportiert wird und dort zu CMP-NeuAc aktiviert wird. CMP-NeuAc wird dann aus dem Kern in den Golgi transportiert, wo die Sialinsäuren von spezifischen Sialyltransferasen auf ihre Glykokonjugate übertragen werden (Abb. 3). Die *de novo* Biosynthese von Sialinsäuren zweigt von der Glykolyse ab, in dem aus Fruktose-6-phosphat Glucosamin-6-phosphat gebildet wird, was von der Glutamin-Fruktose-6-phosphat-Aminotransferase katalysiert wird. Die Aminierung an C-2 leitet also zum Aminozuckerstoffwechsel über. Diese neu entstandene Aminogruppe wird im nächsten Schritt durch die Glucosamin-6-phosphat-*N*-Acetyltransferase acetyliert. Der Donor für die Acetylgruppe ist das Acetyl-Coenzym A. Das *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat (GlcNAc-6-P) wird anschließend mit Hilfe einer Mutase in *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat (GlcNAc-1-P) umgewandelt (Abb. 3). Ausgehend vom GlcNAc-1-P entsteht in mehreren enzymatischen Schritten schließlich die *N*-Acetylneuraminsäure (NeuAc). Neben der *de novo* Biosynthese können *N*-Acetylhexosamine auch über die Nahrung aufgenommen werden oder durch den Abbau von Oligosacchariden wiederverwertet werden. Diese Zucker werden dann durch entsprechende Kinasen wieder in den Aminozuckerstoffwechsel zurückgeführt. So wandelt zum Beispiel die *N*-Acetylglucosamin-Kinase GlcNAc in GlcNAc-6-P um.

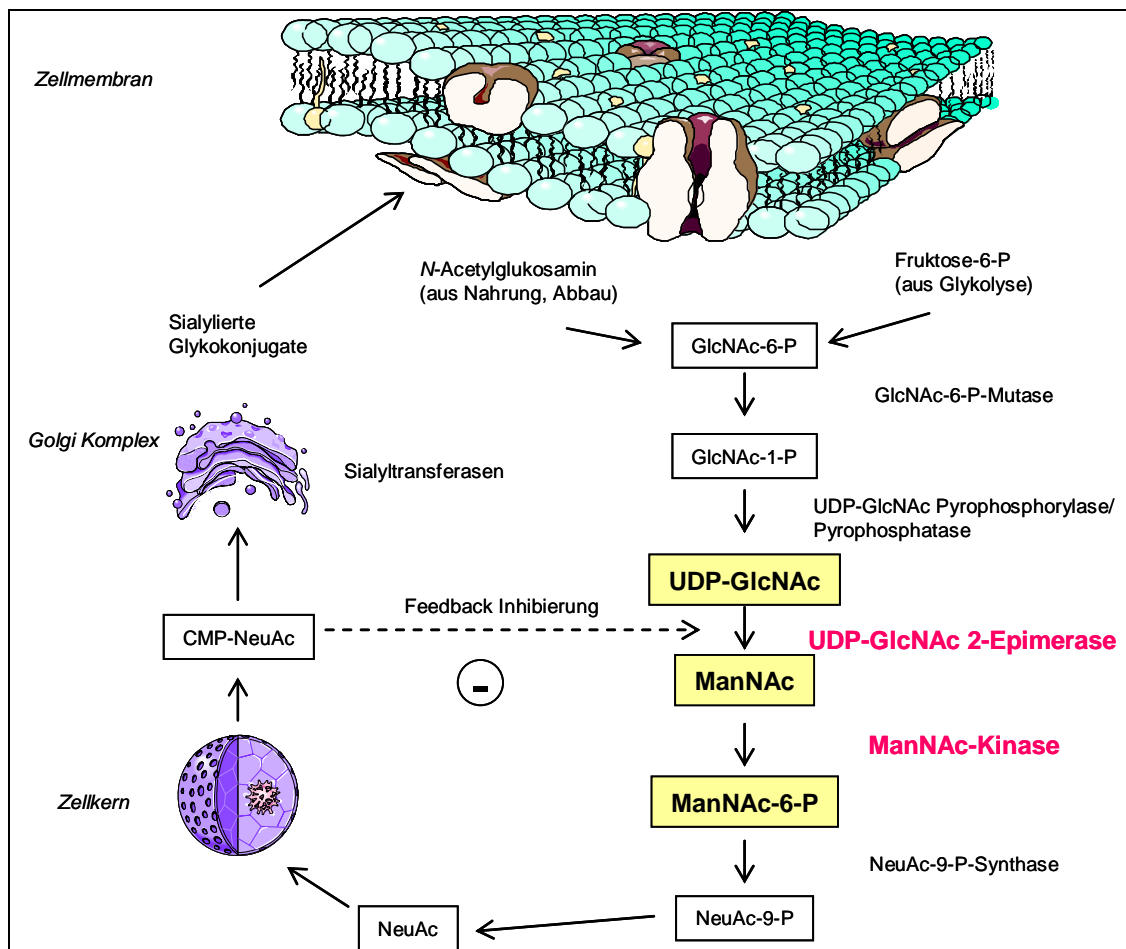


Abbildung 3: Biosyntheseweg der Sialinsäuren. Das bifunktionelle Enzym UDP-GlcAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE) ist rot dargestellt.

N-Acetylneuraminsäure (NeuAc) ist der häufigste Vertreter und biosynthetische Vorläufer nahezu aller Sialinsäuren. Sialinsäuren sind eine große Familie von Aminozuckern mit einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen. Sie weisen eine Vielzahl von Modifikationen auf, die zur Bildung von mehr als 50 strukturell unterschiedlichen Derivaten führen (Angata et al. 2002, Schauer et al. 2000). Charakteristisch für Sialinsäuren ist die an C₂ vorkommende Carboxylgruppe, die unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist und eine organische Zuckersäure darstellt (pKs 2,2). Des Weiteren besitzen sie eine an C₅ gebundene Aminogruppe, die immer acyliert ist (Abb. 4) (Varki et al. 1992).

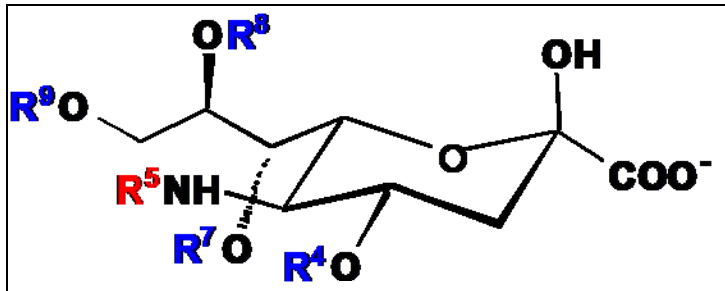


Abbildung 4: Struktur von Sialinsäuren. N-Substituenten der Neuraminsäuren sind R^5 = Acetyl- und Glycolylgruppen. Möglichen O-Substituenten sind R^4 sowie R^7 - R^9 = Acetyl-, Lactyl-, Methyl-, Sulfonyl- sowie Phosphonylgruppen. Bei der N-Acetylneuraminsäure sind alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert.

1.7 Sialinsäuren und ihre biologischen Funktionen

Die strukturelle Vielfalt der Sialinsäuren wird in der Mannigfaltigkeit ihrer biologischen Funktionen widerspiegelt. Durch ihre negative Ladung und besonderen Struktur wirken Sialinsäuren auf ihre unmittelbare Umgebung. Außerdem nutzen viele Bindungspartner Sialinsäuren aufgrund ihrer terminalen Lokalisation zur spezifischen Erkennung. Mit ihrer exponierten terminalen Position auf den Kohlenhydratstrukturen der alle Membranen umspannenden Glykokalix formen Sialinsäuren ein schützendes Schild um die Zellen. Dadurch werden diese Zellen der immunologischen Erkennung entzogen. Besonders Krebszellen sind durch eine hohe Konzentration an Sialinsäuren ausgezeichnet, was sie vor dem Abbau durch Zellen des Immunsystems schützt. Sialinsäuren besitzen demnach eine duale Funktion, einmal die Maskierung von Erkennungsdeterminanten und im Gegensatz dazu die Erkennung von Liganden für Sialinsäure-bindende Proteine/Rezeptoren (Ashwell und Harford, 1982, Schauer 1985, Kelm und Schauer 1997, Mühlhoff et al. 1998). Das Immunsystem kann zwischen eigenen und nicht eigenen Strukturen bezüglich ihres Sialinsäuremusters unterscheiden. Die Zucker sind antigene Determinanten, am auffälligsten ist dies bei den Blutgruppen. Im Folgenden soll nur auf einige Funktionen eingegangen und diese an Beispielen erläutert werden.

1.7.1 Beeinflussung von Struktur und Funktion von Glykokonjugaten

Sialinsäuren haben eine starke Elektronegativität und sind hydrophile und relativ große Moleküle. Dadurch erhöhen sie die thermische und proteolytische Stabilität von Glykokonjugaten (Schauer, 1982). Die Glykokonjugate der Schleimhäute (Magen-Darm-Trakt, Bronchialsystem) von Vertebraten sind hoch sialyliert und tragen durch ihre starke negative Ladung zur Viskosität des Schleims bei (Bhaskar, 1992). Außerdem gibt es eine Vielzahl von Glykoproteinen, die nur in ihrer sialylierten Form biologisch aktiv sind. Zum Beispiel ist die Asialoform des Nukleoporin p62 nicht aktiv und kann so den aktiven Transport der Proteine vom Cytosol in den Zellkern nicht mehr unterstützen (Emig, 1995). Einige Asialoformen scheinen auch aktiv zu sein, und sialyliert eine deutlich höhere Aktivität zu besitzen, wie das Enzym ST8Sia II/STX. Dieses Enzym wird zusammen mit einem weiteren Enzym, dem ST8Sia IV/PST für die Polysialylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM benötigt. Beide Enzyme sind Sialyltransferasen und übertragen die Sialinsäuren auf das Molekül, wo sie α 2,8-gebunden sind. Sie besitzen selber α 2,8-gebundene Sialinsäurereste, die durch einen Prozeß, den man Autopolysialylierung nennt, an die Enzyme angefügt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Autopolysialylierung zwar nicht erforderlich ist für die Enzymaktivität, aber die Polysialylierung des NCAM wird durch die Autopolysialylierung der Enzyme gesteigert (Close, 2001). Die Hormone Somatostatin und Erythropoetin werden ebenfalls durch Sialinsäuren reguliert. Die desialylierten Formen binden bedeutend schlechter ihren Rezeptor (Rens-Domiano und Reisine, 1991). Das Gangliosid G_{M3} wirkt auf die Proliferation von Zellen, in dem es in sialylierter Form die Phosphorylierung des EGF (Epidermal-Growth-Factor)-Rezeptors inhibiert. Durch Deacetylierung der Sialinsäuren des G_{M3} wird diese Hemmung wieder aufgehoben (Bremer et al. 1986, Hanai et al. 1988). Des Weiteren beeinflussen Sialinsäuren die biologische Halblebenszeit von Glykoproteinen. So wird der Acetylcholin-Rezeptor vermutlich durch Sialylierung vor dem Abbau durch Proteasen geschützt (Prives 1980). Einige Serumproteine aus dem Blut werden in ihrer desialylierten Form vom Asialoglykoproteinrezeptor der Hepatocyten erkannt und gebunden, anschließend endocytisch von den Hepatocyten aufgenommen und abgebaut (Ashwell und Harford 1982). So wird auch das Hormon

Erythropoetin, was die Differenzierung von Erythroidvorläuferzellen zu reifen roten Blutkörperchen induziert, in seiner desialylierten Form vom Asialoglykoproteinrezeptor gebunden und dem Blutstrom entzogen (Goldwasser et al. 1973, Fukuda et al. 1989).

1.7.2 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion

Adhäsionsprozesse sind entscheidend an der gerichteten Zellwanderung beteiligt und spielen somit eine bedeutende Rolle während der Entwicklung und Organogenese, aber auch bei Entzündungsprozessen, Tumorwachstum und Metastasierung. Als Liganden für spezifische Sialinsäure-bindende Lektine spielen Sialinsäuren eine entscheidende Rolle. Unter den Sialinsäure-bindenden Lektinen gibt es zwei herausragende Gruppen, die Selektine und Siglecs (Sialic acid-binding Ig superfamily lectins). Ein bekanntes Beispiel ist das durch L-, P- und E-Selektin, die spezifisch sialylierte Strukturen erkennen, vermittelte Einwandern von Leukozyten in aktiviertes Gefäßendothel. Dabei kommt es zunächst zum sogenannten „Rolling“, wobei die Leukozyten durch Wechselwirkung der Selektine aus dem Blutstrom abgebremst werden (Lasky 1995, Tedder 1995). Die Leukozyten exprimieren L-Selektin und die Endothelzellen P- und E-Selektin auf ihrer Oberfläche. Diese Selektine erkennen Tetrasaccharide vom Typ Sialyl-Lexis^x (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-R) oder Sialyl-Lewis^a (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-4]GalNAc β 1-R) (Phillips et al. 1990, Bevilacqua et al. 1991, Polley et al. 1991, Berg et al. 1991). Die feste Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel und das Einwandern (Homing) in das entzündete Gewebe wird anschließend durch Integrine vermittelt. Auch bei diesem Prozess spielen die Sialinsäuren eine wichtige Rolle, denn je geringer der Sialylierungsgrad der Bindungspartner, desto stärker ist ihre Adhäsion (Takeda 1987). Die Siglecs bilden im Menschen mit 13 verschiedenen Molekülen die größte Familie Sialinsäure-bindender Lektine (Crocker 2002, Varki und Angata 2006). Einige bekannte Vertreter dieser Familie sind Sialoadhesin (Sn oder Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3) und MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein oder Siglec-4). Alle Siglecs sind integrale Membranproteine, die aus einer extrazellulären Domäne mit einer (oder im Falle von Siglec-12 mit zwei) einheitlichen und homologen N-terminalen V-Ig Domänen bestehen, gefolgt von unterschiedlich vielen C2-Ig

Domänen, die zwischen 16 im Falle von Sn/Siglec-1 und 1 im Falle von CD33/Siglec-3 variieren. Des Weiteren besitzen sie eine Transmembrandomäne mit einem kurzen cytosolischen Schwanz. Die größte Homologie zwischen den Siglecs besteht in der V-Ig Domäne und diese ist für die Erkennung und Bindung an die Sialinsäuren essentiell. Allen gemein ist ein konserviertes Arginin in der N-terminalen V-Ig Domäne, das eine Salzbrücke mit der Carboxylgruppe der Sialinsäuren bildet (Tang et al. 1997, Crocker et al. 1999, Angata und Varki 2000, Angata et al. 2001). Siglecs werden bevorzugt auf Zellen des Immunsystems exprimiert (Crocker und Varki 2001). Das Sn/Siglec-1 wird ausschließlich auf Makrophagen exprimiert und hat dort einen Einfluss auf die Interaktion der Makrophagen mit anderen Zellen des Immunsystems (Crocker et al. 1997, Hartnell et al. 2001). Es erkennt spezifisch α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren. Dagegen bindet CD22/Siglec-2 spezifisch an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren und ist an der homophilen Interaktion von B-Zellen beteiligt (Tedder et al. 1997). Das MAG/Siglec-4 bevorzugt α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, die O-glykosidisch an die Glykokonjugate gebunden sind und ist eine Komponente der Myelinscheide. Es wird ausschließlich auf Oligodendrocyten und Schwann-Zellen exprimiert, wobei es in einem Sialinsäure-abhängigem Muster an Neuronen bindet (Kelm et al. 1994, Schachner und Bartsch 2000).

Ein weiteres Beispiel ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM. Dieses zur Familie der Immunglobuline gehörende Molekül vermittelt nicht nur homophile, sondern auch heterophile Zell-Zell-Interaktionen. Im embryonalen Gewebe ist es mit Polysialinsäuren (PSA) modifiziert und mindert aufgrund seiner sterischen und elektrostatischen Eigenschaften die Zell-Zell-Interaktion. In Versuchen bei denen embryonale Karzinomzellen von Mäusen mit Retinsäure zur neuronalen Differenzierung induziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die polysialylierte „embryonale“ Form des NCAM exprimiert wird (Husmann et al. 1989). Während der Entwicklung werden die PSA-Ketten immer kürzer und erlauben so eine stärkere Adhäsion zwischen den Zellen, so dass im adulten Stadium eine feste Adhäsion zwischen den Nervenzellen entsteht. Sialinsäuren tragen dadurch direkt zur Plastizität des Nervensystems bei und spielen eine wesentliche Rolle beim Lernen und der Ausbildung des Gedächtnisses (Lackie et al. 1994, Eckhardt et al. 2000, Bruses und Rutishauser 2001).

1.7.3 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene

Als terminale Komponenten von Glykanstrukturen der Zelloberfläche bilden Sialinsäuren eine Andockstelle für viele Viren, Parasiten, Bakterien oder Toxine und leiten den Schädigungsprozess der Zelle ein. Ein Beispiel sind die Influenzaviren, die mit Hilfe ihres Oberflächenproteins Haemagglutinin an sialylierte Strukturen der Wirtszelle binden können. Influenza A-Viren erkennen spezifisch α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, wohingegen Influenza B-Viren α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren erkennen. Experimente mit *N*-Acylneuraminsäuren, die biochemisch modifiziert waren, zeigten eine spezielle Bindung des Influenza A-Virus an die *N*-Acetylgruppe der Sialinsäuren (Keppler et al. 1995). 9-O-Acetylierung der Sialinsäure verhindert die Bindung der Influenzaviren A und B, wohingegen das Influenza C-Virus spezifisch an diese 9-O-acetylierte Sialinsäure bindet (Zimmer et al. 1994). Das Virus deacetyliert dann die Sialinsäure mit Hilfe einer viruseigenen 9-O-Acetylerase (Herrler et al. 1985). Für die Entstehung von Magengeschwüren und Gastritis wird das Bakterium *Helicobacter pylori* verantwortlich gemacht. Es bindet über α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren an die Magenschleimhaut und infiziert sie (Hirno et al. 1996). In Schleimhautzellen, die mit *H. pylori* infiziert waren, konnte eine erhöhte Sialylierung nachgewiesen werden (Bode et al. 1988). Viele Toxine von Erregern nutzen zur Bindung an die Zelloberfläche spezifische sialylierte Glykolipide, die so genannten Ganglioside, und werden anschließend Rezeptor-vermittelt endocytiert. Das Cholera-Toxin, welches vom Bakterium *Vibrio cholerae* produziert wird, ist ein lösliches Lektin mit einer hohen Spezifität zu einem sialyliertem Glykolipid, dem Gangliosid G_{M1} (Richards et al. 1979).

1.7.4 Antigenmaskierung

Antigene bestimmter Erreger können durch Sialylierung maskiert werden und so der Immunerkennung entkommen. Bekanntes Beispiel ist der Erreger der Chagaskrankheit, *Trypanosoma cruzi*. Er bindet an Sialinsäuren der Wirtszelle und überträgt mittels einer Transsialidase die Sialinsäuren der Wirtszelle auf seine eigene

Oberfläche. Diese Transsialidase besitzt sowohl Sialidase- als auch Sialyltransferase-Aktivität (Schenkman et al. 1991, Colli et al. 1993, Tomlinson et al. 1994).

Tumorzellen nutzen ebenfalls Sialinsäuren als Tarnkappe, um ihrer Vernichtung durch sogenannte Natürliche Killerzellen (NK) zu entkommen (Dennis und Laferte, 1985). Nach Entfernung der Sialinsäuren von der Oberfläche der Tumorzellen durch Sialidasebehandlung können diese dann leichter von den NK erkannt und vernichtet werden (Ahrens und Ankel 1987). Die erhöhte Oberflächensialylierung vieler Karzinome korreliert häufig mit ihrer Malignität (Fogel et al. 1983, Hakomori et al. 1989, Bresalier et al. 1990, Bhavanandan 1991, Sawada et al. 1994). Colonkarzinom- und Melanomzellen exprimieren vermehrt Sialyl-Lewis^a auf ihrer Zelloberfläche und wie beim „Rolling“ der Leukocyten führt dies zu einer erhöhten Selektin-vermittelten Invasivität der Tumorzellen (Kageshita et al. 1995). Wie bereits erwähnt, wird polysialyliertes NCAM nur in embryonalem Gewebe exprimiert, doch bei einigen Tumorarten, wie zu Beispiel dem Willms-Tumor, der bei Kindern häufigste Nierentumor, wird PSA-NCAM ebenfalls exprimiert und dadurch die Krebszellen maskiert und vom Immunsystem nicht mehr erkannt (Roth 1987, 1988, Zuber und Roth 1990). Auch Neuroblastome und Lungenkarzinome exprimieren PSA-NCAM (Livingston et al. 1988, Moolenaar et al. 1990).

1.7.5 Bedeutung der Sialinsäuren für die Entwicklung

Sialylierte Glykokonjugate werden Zell- und Organ-spezifisch exprimiert. Ihre Expression ist entwicklungsabhängig durch die Expression der entsprechenden Sialyltransferasen reguliert. Die Zona pellucida (Eihülle) stellt eine Spezies-spezifische Barriere für Spermien um die Oocyte dar (Parillo et al. 2000). Bei der Maus besteht sie aus drei unterschiedlichen Glykoproteinen, wobei einige dieser Glykokonjugate durch Sialinsäuren maskiert vorliegen können. Das mZP3 ist solch ein sialyliertes Protein und ist an der Bindung des Spermiums beteiligt. Für diese Bindung sind die Sialinsäuren allerdings nicht essentiell (Noguchi und Nakano 1993, Litscher und Wassarman 1996, Liu et al. 1997). Mäuse, die das mZP3 Protein nicht exprimieren, bilden keine Zona pellucida um ihre Oocyte und sind infertil (Liu et al. 1996). Embryonalzellen maskieren ihre Antigenität durch Sialinsäuren, damit sie vor dem mütterlichen Immunsystem geschützt sind (Schauer 1988). Wird die

sialinsäurehaltige Zona pellucida von der Blastocyste entfernt, so erkennt das Komplementsystem die antigenen Determinanten und es erfolgt die Lyse der Blastocyste. Nach der Befruchtung sinkt zunächst der Sialyierungsgrad der Oocyte (Katsumata et al. 1996). Frühe embryonale Zellen sind höchst sensitiv gegenüber dem Komplementsystem. Mit einsetzender Differenzierung und Zunahme der Sialylierung embryonaler Stammzellen zu Endoderm nimmt die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem zu. Ebenso zeigen Embryonen der Maus im Morula- und Blastocystenstadium hohe Sensitivität gegenüber dem Komplementsystem und werden mit weiterer Entwicklung resistent (Kircheis et al. 1995 und 1996). Zusammen mit der Proliferation und Differenzierung von Zellen ist der programmierte Zelltod ein essentieller Prozess während der Embryogenese. Auch in Fibroblasten von 8 und 16 Tage alten Hühnerembryonen konnte eine Zunahme an Sialinsäuren beobachtet werden (Vernay et al. 1983). Die Expression der Sialinsäuren wird durch die Aktivität spezifischer Sialyltransferasen reguliert. Die ST3Gal III, eine α 2,3-Sialyltransferase, die die Sialylierung von SiaLe^x und SiaLe^a katalysiert, wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung der Maus untersucht. Dabei zeigte sich, dass an Tag 9 das Enzym ubiquitär exprimiert wird und in späteren Entwicklungsstadien nur noch in bestimmten Organen wie Leber, Lunge und Vorderhirn nachgewiesen werden kann (Ji et al. 1999). Eine andere Sialyltransferase, die ST3Gal IV, die die Sialylierung des Gangliosides GM3 katalysiert, wird ähnlich wie ST3Gal III ubiquitär an Tag 9 und 11 exprimiert, wohingegen sie an Tag 13 und 15 nur noch im Telencephalon und in der Leber nachweisbar ist (Ji et al. 2000). Ganglioside sind eine Familie von sialinsäurehaltigen Glykosphingolipiden, die vermehrt in neuronalen Membranen vorkommen und die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Hirns spielen. In Studien an 10 und 11 Tage alten Embryonen konnte gezeigt werden, dass sialinsäurehaltige Ganglioside aktiv synthetisiert werden (Seyfried 1987). Maus-Mutanten des sogenannten T-Locus zeigen Veränderungen in embryonaler Entwicklung und Zelldifferenzierung. Der T-Locus ist eine größere Region auf Chromosom 17 und schließt mehrere Gene ein. Mäuse, die homozygot sind für die rezessive *t^{wl}* Mutation im T-Locus, zeigen einen Defekt in neuronaler Differenzierung und eine verringerte Expression sialylierter Ganglioside (Bouvier und Seyfried 1989). Die beiden Polysialyltransferasen STX (ST8SiaII) und PST (ST8SiaIV) werden in der Maus ebenfalls entwicklungsabhängig

reguliert. An Tag 8 ist die Expression noch schwach, nimmt aber stetig zu und wird bis 10 Tage nach der Geburt stark exprimiert. Im adulten Gehirn wird dann nur noch PST exprimiert und auch die Polysialylierung nimmt im adulten Hirn ab (Ong et al. 1998).

Alle bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Sialylierung von Glykokonjugaten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spielen und dass Sialinsäuren bereits in frühen embryonalen Stadien Gewebe- und Entwicklungs-spezifisch exprimiert werden.

1.8 Zielsetzung

1. Da bisher sehr wenig über die Regulation der GNE bekannt ist, sollen verschiedene Fragmente dieses Enzyms mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems auf ihre Fähigkeit, Oligomere zu bilden, untersucht werden. Des Weiteren sollen in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening mögliche interagierende Proteine identifiziert werden, in dem eine cDNA-Genbank von fötalem humanem Hirn durchsucht wird. Die Interaktion dieser Proteine mit der GNE sollen mittels Co-Immunpräzipitation oder *pull down*-Assays bestätigt werden und Grundlage für weitere Untersuchungen sein.
2. Außerdem sollen embryonale Stammzellen, die GNE-defizient sind, isoliert und kultiviert werden. Sie sollen unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen kultiviert werden und bezüglich ihrer Gesamt- und Oberflächensialylierung untersucht werden. Durch Supplementation von ManNAc soll das Sialinsäuredefizit in den KO-ES-Zellen ausgeglichen werden. Des Weiteren soll die Fähigkeit zur Proliferation der KO-ES-Zellen näher charakterisiert werden, um die Rolle der GNE bei der Entwicklung zu verstehen.