

1. Einleitung

Alle lebenden Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die durch ihre Struktur und Permeabilitätseigenschaften eine Barriere gegen die Außenwelt darstellt, zugleich aber auch den kontrollierten Stoffaustausch mit dieser ermöglicht. Membranen sind sehr komplexe Gebilde mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Sie sind z.B. an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt, sind eng mit Energieumwandlungsprozessen wie Photosynthese und oxidativer Phosphorylierung verknüpft, spielen eine Rolle bei der Aufnahme und Reaktion auf äußere Signale, sind bei Bewegungsvorgängen, Wachstum und Zellteilungen beteiligt und kontrollieren den Informationsfluß zwischen den Zellen und ihrer Umgebung. In die Lipiddoppelschicht der Membranen sind zahlreiche Lipide und Proteine mit verschiedensten Kohlenhydratstrukturen eingelagert. Diese Glykokonjugate vermitteln oft den Kontakt zwischen Biomolekülen und damit den Signalfluß zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Als terminale Komponenten der Oligosaccharidstrukturen von Glykokonjugaten finden sich häufig *N*-Acetylneuraminsäuren (= Sialinsäuren). Deshalb sind die Sialinsäuren in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt vieler Forschungsvorhaben gerückt.

1.1 Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren

Die ersten Sialinsäuren wurden 1935 von E. Klenk aus Glycolipiden des Gehirns bzw. 1936 von G. Blix aus submaxillarem Mucin isoliert (Klenk, 1935; Blix, 1936). Als essentielle Bestandteile von zahlreichen Glykokonjugaten sind Sialinsäuren jedoch in vielen Zellen reich vertreten; sie kommen in den meisten Körperflüssigkeiten, insbesondere im Blut, an Zelloberflächen und auf Nervenzellen verstärkt vor.

1.1.1 Struktur von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine Familie von sauren Aminoazuckern, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht (Abb. 1.1). Die C-2-Position ist stets carboxyliert, während die C-5-Position eine Aminogruppe trägt. Die unsubstituierte Form, die Neuraminsäure, tritt in der Natur nur äußerst selten auf (Manzi *et al.*, 1990). Gewöhnlich wird die Aminogruppe acetyliert, so daß der häufigste Vertreter der Sialinsäuren entsteht, die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Diese ist biosynthetischer Vorläufer für nahezu alle der 50 natürlich vorkommenden Sialinsäuren (Angata und Varki, 2002). Die große Vielfalt der Sialinsäuren entsteht durch die Art der Aminosubstituenten sowie Anzahl, Position und Kombination von Hydroxylsubstituenten an den C-Atomen C-4, C-7, C-8 und C-9. Modifikationen der Hydroxylgruppen durch Acetyl-, Lactoyl-, Sulfonyl-,

Phosphonyl- oder Methylgruppen wurden nachgewiesen (Schauer et al, 1995). Als Substituenten der Aminogruppe sind Acetyl- und Glycolylgruppen beschrieben (Varki, 1992). Diese Modifikationen erhalten die Sialinsäuren im *trans*-Golgi-Netzwerk, nach ihrer Bindung an das Oligosaccharid. Lediglich die Oxidation der Acetylgruppe von CMP-Neu5Ac zur Glycolylgruppe erfolgt im Cytosol.

Sialinsäuren bilden in Lösung durch intramolekulare Kondensation spontan einen Pyranosering zwischen C-2 und C-6, so daß ein Halbketal entsteht. In Glycokonjugaten findet man Sialinsäuren in der α -Konformation, eine Ausnahme bildet der aktivierte Nucleotidzucker der Sialinsäure, CMP-Neu5Ac, in dem das anomere Kohlenstoffatom β -Konformation aufweist (Kolter und Sandhoff, 1997).

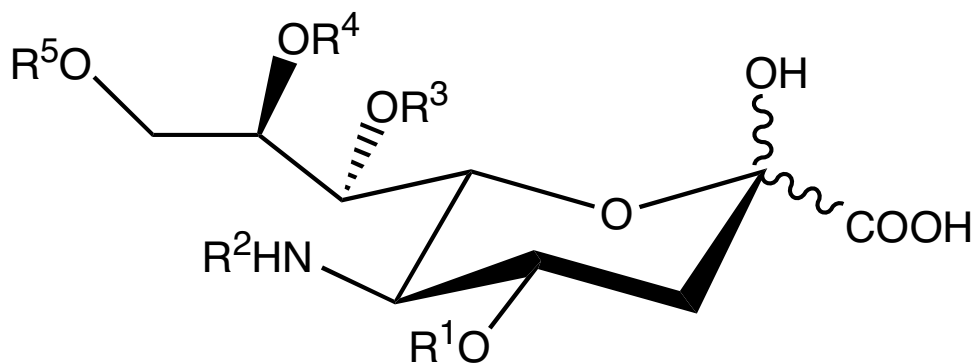


Abbildung 1.1: Struktur von Sialinsäuren.

Sialinsäuren sind N-acylierte ($R^2 =$ Acetyl- oder Glycolylgruppen) Derivate der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen als mögliche O-Substituenten (R^1, R^3, R^4, R^5). Bei Neu5Ac, der häufigsten Sialinsäure, liegen alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert vor. Die Carboxylatgruppe liegt bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vor.

1.1.2 Vorkommen von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind essentielle Bestandteile von Glycokonjugaten der Deuterostomia, von Echinodermen bis zum Menschen konnten sie nachgewiesen werden (Corfield, 1982). Bei anderen Lebensformen sind sie dagegen eher die Ausnahme. In der Deuterostomia-Linie kommen alle Varianten der O-Modifikation vor (Angata und Varki, 2002). Wirbeltiere besitzen in der Regel nur O-acetylierte und eventuell noch O-lactoylierte Sialinsäuren. Die Vielfalt der Sialinsäuren kann sich bei einzelnen Arten stark unterscheiden. So konnten in der Speicheldrüse des Rindes 14 verschiedene Sialinsäuren identifiziert werden (Reuter *et al.*, 1983), humanes Gewebe enthält dagegen nur drei verschiedene Typen von Sialinsäuren – die Neu5Ac, die 9-O-acetylierte Neu5Ac (Neu5,9Ac₂) und die 9-O-lactosylierte Neu5Ac (Neu5Ac9Lt). N-Glycoylneuraminsäure (Neu5Gc) kommt nur in fötalem Gewebe und in einigen Tumoren vor, im adulten humanen Organismus wirkt sie dagegen antigen (Kawai *et al.*, 1991; Kean, 1991). Das Vorkommen der einzelnen Sialinsäuren wird von den

Aktivitäten zahlreicher spezifischer Sialyltransferasen bestimmt (Paulson *et al.*, 1989; Basu *et al.*, 1995). Die Verteilung der Sialinsäuren ist dabei spezie-, organ-, und ontogenesespezifisch (Varki, 1993).

Protostomen besitzen in der Regel keine Sialinsäuren. Trotzdem konnten Sialinsäuren eindeutig in einigen Bakterien und niederen Eukaryoten gefunden werden (Angata und Varki, 2002). Kürzlich wurden sialylierte Glycolipide, Ganglioside, im Gewebe von Tintenfischen entdeckt (Saito *et al.*, 2001). Weiterhin konnte bei Insekten die Expression von Sialinsäuren in bestimmten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Roth *et al.*, 1992; Malykh *et al.*, 1999). Auch einige Protozoen und Pilze besitzen Sialinsäuren (Barry, 1959; Alviano *et al.*, 1999). In Bakterien bilden sie Komponenten der Polysaccharide der äußeren Hülle. Die Sialinsäuren dienen den Bakterien in erster Linie als Schutzbarriere vor der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem der Wirtsorganismen. Sie kommen hier weniger als terminale, sondern in der Regel als interne Zuckereinheiten der Polysaccharide oder in Form von Polysialinsäure vor und können entweder α 2,8- oder α 2,9-verknüpft sein.

In Pflanzen und Hefen konnten bisher keine Sialinsäuren nachgewiesen werden.

1.1.3 Sialylierte Oligosaccharidstrukturen auf Proteinen und Lipiden

In Vertebraten kommen die Sialinsäuren auf N-Glycanen und O-Glycanen zahlreicher Glycoproteine und in den Glycolipiden als Ganglioside vor. Charakteristisch ist ihre terminale Position in den Zuckerketten. N-Glycane sind über ein *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) an Asparagin in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr von Glycoproteinen gebunden und besitzen eine gemeinsame Kernstruktur aus zwei GlcNAc- und drei Mannoseresten (Abb. 1.2). Der variable Strukturteil läßt sich in drei Klassen unterteilen (Schachter, 2000). Mannosereiche N-Glycane besitzen neben der Kernstruktur nur noch Mannosereste. Die Oligosaccharide des komplexen Typs besitzen zusätzlich *N*-Acetyllactosamineinheiten, Fucosen und Sialinsäuren. Der hybride Typ stellt eine Mischform aus mannosereichem und komplexem Typ dar. Die Sialinsäuren sind an das nicht-reduzierende Ende der Oligosaccharide des komplexen Typs in α 2,3- oder α 2,6-Stellung gebunden. Eine Sonderform der Sialylierung stellt die Polysialylierung auf den N-Glycanen des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) dar. Polysialinsäure besteht aus einer linearen Kette von bis zu 200 α 2,8-verknüpften Sialinsäuren (Mühlenhoff *et al.*, 1998).

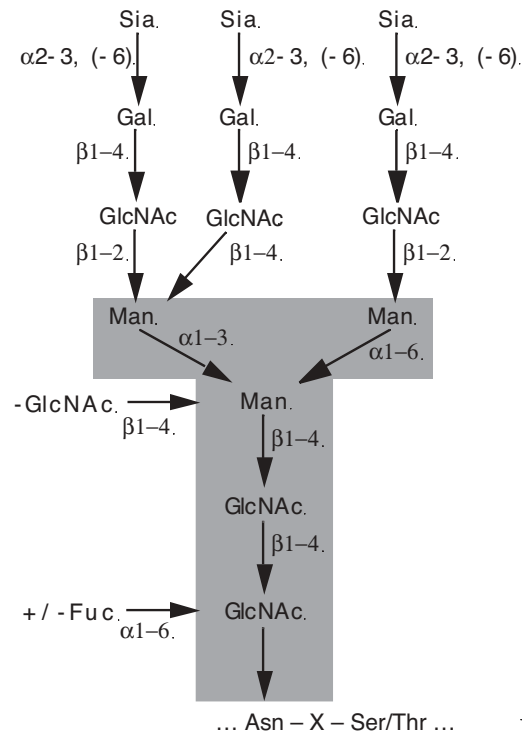


Abbildung 1.2: Grundstruktur eines triantennären, komplexen N-Glycans.

Die für alle N-Glycane gemeinsame Kernstruktur ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$) ist grau unterlegt. $\dots \text{Asn-X-Ser/Thr} \dots$ ist das Aminosäure-Sequenzmotiv für die N-Glycosylierung. Neben dem in dieser Abbildung gezeigten triantennären Glycan sind bei Kohlenhydratstrukturen des komplexen Typs zusätzlich mono- und biantennäre Formen sowie auch tetra- und pentaantennäre Formen möglich (Fukuda, 1994).

O-Glycane sind über *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) an einen Serin- oder Threoninrest von Glycoproteinen gebunden. Ihre Struktur ist sehr viel heterogener als die von N-Glycanen (van den Steen *et al.*, 1998), so daß es bis heute noch keine einheitliche Nomenklatur gibt. Für die Lokalisation von Sialinsäuren in O-Glycanen gilt jedoch ebenfalls die Regel, daß sie terminal $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -verknüpft an das Oligosaccharid gebunden sind.

Sialylierte Glycolipide werden als Ganglioside bezeichnet. Die höchste Konzentration von Gangliosiden ist in der grauen Hirnsubstanz zu finden (6% des Gesamtlipids). Ganglioside bestehen aus einer Ceramideinheit mit einer Sphingosinbase und einer als Amid an die 2-Aminogruppe des Sphingosins gebundenen Fettsäure. Die Oligosaccharide sind an das Ceramid über die C-1-Hydroxylgruppe gebunden (Hakomori, 2000). Die Sialinsäuren der Ganglioside sind nicht nur $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpft, man findet auch Oligosialyleinheiten, bei denen, analog zur Polysialylierung, die Verknüpfung der Sialinsäuren untereinander über $\alpha 2,8$ -Bindungen erfolgt.

1.2 Biologische Funktion von Sialinsäuren

Sialinsäuren tragen entscheidend zur Strukturvielfalt von Glycokonjugaten bei. Deshalb können zahlreiche biologische Funktionen direkt mit Sialinsäuren in Verbindung gebracht werden. Durch ihre physikalischen Eigenschaften, wie ihre Ladung, ihren sauren Charakter und ihre räumliche Ausdehnung, wirken Sialinsäuren direkt auf ihre Umgebung ein. Sialinsäuren können biologisch aktive Strukturen maskieren und so die Erkennung dieser Strukturen verhindern (Kelm und Schauer, 1997). Andererseits kann die Strukturvielfalt der gebundenen Sialinsäuren auch von den entsprechenden Bindungspartnern zur spezifischen Erkennung genutzt werden (Lasky, 1995). Die negative Ladung der Sialinsäuren sorgt in vielen Fällen für die Abstoßung zwischen Zellen untereinander oder auch zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Shimamura *et al.*, 1994). Im folgenden sollen die vielfältigen biologischen Funktionen von Sialinsäuren an einigen Beispielen dargestellt werden.

1.2.1 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion

Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion sind elementare Prozesse für die gerichtete Zellwanderung während der Ontogenese, die Gewebeformation während der Organogenese, sowie Endzündungsreaktionen, malignes Zellwachstum oder Metastasierung. Die terminale Position von Sialinsäuren in Glycokonjugaten und dadurch die Exposition auf den Oberflächen von Zellen führt zur Beteiligung dieser Zucker an vielen Adhäsionsvorgängen. Oftmals können Zelladhäsionsmoleküle ihre Bindungspartner nur an den spezifischen Sialylstrukturen erkennen. Für die Vermittlung dieser Adhäsionsvorgänge sind spezifische sialinsäurebindende Lektine wichtig. Die zwei bekanntesten Familien sind die Selektine und die Siglecs („Sialic acid-binding Ig superfamily lectins“). Die Selektine sind z.B. an der Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen beteiligt. Sie vermitteln das sogenannte „Rolling“, das die Einwanderung der Leukozyten in aktivierte Gefäßendothel initiiert (Lasky, 1995). Die Selektine werden entweder auf Leukozyten (L-Selektin) oder auf dem aktivierten Endothel (P- und E-Selektin) exprimiert. Sie binden Calcium-abhängig Strukturen, die Tetrasaccharide vom Typ Sialyl-Lewis^x oder Sialyl-Lewis^a enthalten; L-Selektin bindet bevorzugt an 6'-Sulfo-Sialyl-Lewis^x (Varki, 1997). Die Invasion in das Epithel wird anschließend von Integrinen und Molekülen der Immunglobulinsuperfamilie vermittelt. Die Intensität der Adhäsion wird dabei vom Sialinsäuregehalt der Bindungspartner moduliert, wobei geringer sialylierte Strukturen eine stärkere Adhäsion zur Folge haben (Takeda, 1987).

Siglecs sind die größte Familie sialinsäurebindender Lektine in Säugetieren. Sie besitzen eine N-terminale Domäne, die strukturell der variablen Domäne von Immunglobulinen ähnelt. Weiterhin weisen sie eine unterschiedliche Anzahl (1-16) von Domänen, ähnlich der C2-Domäne von Immunglobulinen, einen Transmembranteil und einen cytoplasmatischen Schwanz auf (Crocker und Varki, 2001). Beim Menschen sind 11 verschiedene Siglecs gefunden worden, die meisten finden sich auf den Zellen des Immunsystems. Die Funktionen der einzelnen Siglecs sind bis heute nur unzureichend geklärt; einige wenige, seit längerem bekannte Vertreter sind jedoch intensiver untersucht worden. Siglec1/Sialoadhäsine wird ausschließlich auf Makrophagen exprimiert und reguliert die Interaktion dieser Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems über die Bindung α 2,3-gebundener Sialinsäuren (Hartnell *et al.*, 2001). Siglec2/CD22 ist an der homophilen Interaktion von B-Zellen beteiligt und bindet ausschließlich α 2,6-gebundene Sialinsäuren (Tedder *et al.*, 1997). Siglec4a/Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG) ist nur auf Oligodendrozyten und Schwann-Zellen zu finden und dient der Aufrechterhaltung der Struktur der Myelinscheide (Schachner und Bartsch, 2000).

Ein anderes Zelladhäsionsmolekül, das NCAM, wird in seinem Adhäsionsverhalten direkt durch Sialinsäuren moduliert. NCAM vermittelt homophile und heterophile Zell-Zell-Interaktionen. In embryonalen Zellen ist ein Großteil der NCAM-Moleküle polysialyliert. Aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer räumlichen Ausdehnung erlauben diese Polysialinsäureketten nur schwache Interaktionen zwischen den Zellen. Im Laufe der Ontogenese verkürzen sich die Polysialinsäureketten, so daß es zu einer verstärkten Adhäsion zwischen den Nervenzellen im adulten Organismus kommt (Seki und Arai, 1993).

1.2.2 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene

Nicht nur endogene sialinsäurebindende Lektine eines multizellulären Organismus nutzen Sialinsäuren als Bindungspartner auf ihren Zielzellen, sondern auch Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten. So besitzen Viren Hämagglutinine, sialinsäurebindende Lektine, die die Agglutination von Erythrozyten (Hämozyten) vermitteln können. Das am besten untersuchte Hämagglutinin ist das des Influenza A-Virus. Seine Spezifität für bestimmte Sialinsäuretypen hängt streng von der Sialylierung der Wirtszelle (z.B. von Mensch, Huhn oder Schwein) ab (Suzuki *et al.*, 2000). Durch Kreuzinfektionen von Influenza A-Viren, insbesondere bei Haustieren untereinander und mit Menschen, verstärkt durch horizontalen Gentransfer unter den Virenspezies, können sich tierische Viren an die Sialylierung humaner Zellen anpassen und so zu saisonalen Epidemien führen (Ito *et al.*, 1998). Das Hämagglutinin der Influenza C-Viren bindet nicht nur spezifisch an Neu5,9Ac₂, sondern deacetyliert die gebundene

Sialinsäure zusätzlich durch eine 9-O-Acetyl-Esteraseaktivität (Herrler *et al.*, 1985). Herrmann *et al.* (1997) konnten zeigen, daß Polyomaviren sehr spezifische Sialinsäuren erkennen und nicht mehr in der Lage sind an modifizierte Sialinsäuren zu binden.

Die sialinsäurebindenden Lektine von pathogenen Bakterien werden Adhäsine genannt und vermitteln die Bindung des Mikroorganismus an die Wirtszelle (Ofek und Sharon, 1990). Die Expression der Adhäsine erfolgt oft stammspezifisch und reguliert so die Infektion definierter Gewebe. *Helicobacter pylori* besitzt zwei Adhäsine, die selektiv an Ganglioside oder Glycoproteine binden (Miller-Podraza *et al.*, 1997). Das Adhäsin von *E. coli* K99 bindet spezifisch Neu5Gc, die besonders stark im Darm von Schweinen exprimiert ist, den Wirten von *E. coli* K99 (Yuyama *et al.*, 1993). In einigen Fällen können auch die Toxine von Mikroorganismen Sialinsäuren binden. So binden die Toxine von Cholera, Botulinus und Tetanus an spezifische sialylierte Ganglioside ihrer Wirtszellen und werden anschließend durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen (Richards *et al.*, 1979; Schengrund *et al.*, 1991).

1.2.3 Sialinsäuren maskieren antigene Determinanten

Sialinsäuren können antigene Determinanten maskieren und so die Erkennung durch das Immunsystem verhindern. *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagaskrankheit, einer ähnlich wie Malaria verlaufenden Infektionskrankheit, bindet an Sialinsäuren von Glykokonjugaten auf der Oberfläche der Wirtszellen. Die Neuraminidase- und Sialyltransferase-Aktivität des Erregers transferiert anschließend die wirtseigenen Sialinsäuren auf die Zelloberfläche des Erregers und überdeckt so seine antigenen Strukturen (Colli, 1993; Tomlinson, 1994).

Embryonale Zellen sind ebenfalls durch Sialinsäuren geschützt und entgehen so der Interaktion mit dem mütterlichen Immunsystem (Schauer, 1985). Wird die schützende Zona pellucida von Blastocysten entfernt, so werden sie innerhalb kürzester Zeit durch das Komplementsystem erkannt und lysiert. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) weisen nur eine schwache membrangebundene Sialylierung auf, nach Differenzierung erhöht sich der Sialinsäuregehalt und sie werden unempfindlich gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse (Kircheis *et al.*, 1996).

Sialinsäuren können aber auch selbst immunologische Reaktionen auslösen, wie einige Blutgruppenantigene, die durch spezifische Sialylstrukturen gekennzeichnet sind und nach Sialidasebehandlung ihre Antigenität verlieren (Pilatte *et al.*, 1993).

1.2.4 Sialinsäuren beeinflussen die Struktur und Funktion von Glykokonjugaten

Die Präsenz von Sialinsäuren ist wichtig für die biologische Funktion einiger Glycoproteine. So führt z.B. die Desialylierung des Somatostatinrezeptors zu einer Konformationsänderung und damit zu einer deutlich schlechteren Ligandenbindung (Rens-Domiano und Reisine, 1991). Die Asialoform des Nukleoporins p62, das den aktiven Proteintransport vom Cytosol in den Zellkern unterstützt, zeigt eine stark reduzierte Aktivität (Emig *et al.*, 1995). Eine ähnliche Beobachtung wurde für Erythropoietin gemacht (Wasley *et al.*, 1991), ein Hormon, das die Bildung von Erythrocyten stimuliert. Hierbei beruht die verringerte biologische Aktivität des Asialoproteins allerdings auf einer reduzierten Halbwertszeit im Blut (Egrie und Brown, 2001). In vielen Fällen schützen Sialinsäuren Proteine vor dem Abbau, vermutlich durch sterische Hinderung der proteolytischen Aktivität. Der Acetylcholinrezeptor mit Sialinsäuren als Degradationsschutz liefert eines der am besten untersuchten Beispiele (Olden *et al.*, 1982). Die Zirkulationszeit von Blutzellen wird ebenfalls durch ihren Gehalt an terminalen Sialinsäuren reguliert. Erythrozyten und Thrombozyten verlieren bei ihrer Alterung ihre Sialinsäuren bzw. Sialinsäure-haltige Strukturen und werden dann von Makrophagen erkannt und phagozytiert (Schlepper-Schäfer *et al.*, 1980; Kluge *et al.*, 1992). Ähnliches wird bei Serumglycoproteinen und Antigen-Antikörper-komplexen beobachtet. Sie werden nach Verlust ihrer terminalen Sialinsäuren durch den Asialoglycoproteinrezeptor der Leber erkannt, endocytiert und abgebaut (Ashwell und Harford, 1982). Auf welche Weise die Zellen bzw. Glycoproteine ihre Sialinsäuren bzw. Sialinsäure-haltigen Strukturen verlieren, ist bis heute nicht geklärt.

Das Gangliosid GM3 kann durch seine Sialinsäure direkt die Proliferation von Zellen beeinflussen. Sialyliertes GM3 hemmt die Tyrosin-Phosphorylierung des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors und dadurch das Zellwachstum (Bremer *et al.*, 1986). Durch Deacetylierung der Sialinsäure des GM3 wird diese Hemmung aufgehoben (Hanai *et al.*, 1988). Gleichzeitig wird zusätzlich eine Serin-Phosphorylierung des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors gefördert; deshalb wird das GM3 mit deacetylierter Sialinsäure als Second-Messenger bei der Stimulierung des Zellwachstums diskutiert (Zhou *et al.*, 1994).

1.2.5 Sialinsäuren und Carcinome

Zahlreiche Tumore besitzen eine erhöhte Sialinsäurekonzentration auf ihren Oberflächen (Hakomori, 1989; Bhavanandan, 1991), was mit einer erhöhten Malignität in Verbindung gebracht wird. Zellen des Wilms-Tumors exprimieren sogar

Polysialinsäure auf ihren Zelloberflächen (Roth *et al.*, 1988). In vielen Fällen kann ein linearer Zusammenhang zwischen dem Metastasierungspotential der Tumore und der Konzentration an exprimierter Sialinsäure beobachtet werden (Fogel *et al.*, 1983; Bresalier *et al.*, 1990; Sawada *et al.*, 1994).

Coloncancer- und Melanomzellen exprimieren verstärkt Sialyl-Lewis^a-Strukturen auf ihren Zelloberflächen. Die erhöhte Invasivität dieser Tumorzellen ist vermutlich auf eine gesteigerte selektinvermittelte Adhäsion der Krebszellen zurückzuführen (Kageshita *et al.*, 1995), analog der Interaktion von Leukocyten mit Gefäßendothelien. Viele Krebszellen maskieren ihre antigenen Determinanten auch mit Sialinsäuren, ähnlich wie zahlreiche Pathogene, und entziehen sich so der immunologischen Überwachung (Dennis und Laferte, 1985). Erst nach Entfernung der Sialinsäuren durch Sialidasebehandlung können sie von natürlichen Killerzellen erkannt und lysiert werden (Ahrens und Ankel, 1987).

Auch bei Gangliosiden können maligne Transformationen den Gehalt der gebundenen Sialinsäuren quantitativ und qualitativ stark verändern. Die Ganglioside GD2 und GD3 in Melanomen enthalten deutlich höhere Anteile an Neu5,9Ac₂ (Thurin *et al.*, 1985; Sjoberg *et al.*, 1992). In Darm- und Lungencarcinomen ist vermehrt Neu5Gc an das Gangliosid GM3 gebunden (Higashi, 1990). Bestimmte Typen von Gangliosiden, die von Tumorzellen exprimiert werden, insbesondere solche, die viel Sialinsäuren tragen, haben einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Zellen der Immunantwort. Dieser Aspekt ist hinsichtlich der immunsuppressiven Effekte von Krebs bemerkenswert (Marcus, 1984). Auf der anderen Seite führt, wie bereits beschrieben, eine Deacetylierung von Sialinsäuren des GM3 zu einer Proliferationssteigerung (Hanai *et al.*, 1988).

In vielen Tumorarten konnte ein erhöhter totaler Sialinsäuregehalt und/oder lipidgebundener Sialinsäuregehalt nachgewiesen werden (Sillanauke *et al.*, 1999). Die differentielle Sialylierung wird von der Tumordiagnostik genutzt, indem sie tumorspezifische Sialylstrukturen als Marker verwendet (Bhavanandan, 1991; Dreyfuss *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1995), Neu5,9Ac₂ ist beispielsweise ein Tumormarker für Hautkrebs (Fahr und Schauer, 2001). Aber auch der Serumspiegel von Sialinsäuren wird zur Verlaufskontrolle während der Tumorprogression genutzt (Fischer und Egg, 1990).

1.3 Biosynthese von Sialinsäuren

Einen großen Teil der Zucker, die für die Synthese von Glycokonjugaten benötigt werden, erhalten Zellen aus ihrem Aminozuckerstoffwechsel, meist in Form aktivierter Nukleotidzucker. Eine zentrale Rolle fällt dabei dem UDP-*N*-Acetylglucosamin

(UDP-GlcNAc) zu. Seine Konzentration in Zellen erreicht mit 100-200 μM etwa die Hälfte der Konzentration von ATP (Eriksson *et al.*, 1984). UDP-GlcNAc ist nicht nur wichtig für die Synthese der Oligosaccharidketten von N-Glycanen, O-Glycanen und Glycolipiden, sondern wird auch für die Herstellung von Proteoglycanen und Glycosylphosphatidylinositolen verwendet. Auch für die Modifikation von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen mit O-GlcNAc, einer regulatorischen Modifikation ähnlich der Phosphorylierung, wird UDP-GlcNAc als Donor benutzt. Aus UDP-GlcNAc wird desweiteren UDP-GalNAc gebildet, ein weiterer Nukleotidzucker für die Synthese von Glycokonjugaten. Schließlich ist UDP-GlcNAc in Zellen essentielles Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Sialinsäuren.

1.3.1 Biosynthese von UDP-GlcNAc

Die *de novo*-Biosynthese von UDP-GlcNAc zweigt am Fructose-6-Phosphat von der Glycolyse ab. Katalysiert durch entsprechende Enzyme wird aus Fructose-6-Phosphat in vier Schritten UDP-GlcNAc gebildet (Abb. 1.3). Das Schlüsselenzym der UDP-GlcNAc-Biosynthese ist die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (GFAT; EC 2.6.1.16). Sie katalysiert die Aminierung von Fructose-6-Phosphat am C-2 und sorgt so für die Abzweigung des Aminozuckerstoffwechsels von der Glycolyse. Das tetramere Enzym ist ein komplex reguliertes Enzym, das durch UDP-GlcNAc, Glucose-6-Phosphat und Glucosamin-6-Phosphat inhibiert wird (Tourian *et al.*, 1983; Broschat *et al.*, 2002). Der zweite Schritt der *de novo*-Biosynthese von UDP-GlcNAc wird durch die Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.4) katalysiert. Sie katalysiert die N-Acetylierung von Glucosamin-6-Phosphat durch Acetyl-CoA. Anschließend wird das entstandene GlcNAc-6-Phosphat reversibel von der GlcNAc-Phosphat-Mutase (EC 2.7.5.2) in GlcNAc-1-Phosphat umgewandelt. Der letzte Schritt auf dem Weg zum UDP-GlcNAc ist die Kondensation von GlcNAc-1-Phosphat und UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat (Strominger und Smith, 1959). Diese Reaktion wird durch die UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23) katalysiert. Szumilo *et al.* (1996) konnten zeigen, daß das Enzym auch UDP-GalNAc-Pyrophosphorylase-Aktivität besitzt und bezeichneten es daher als UDP-GlcNAc/GalNAc-Pyrophosphorylase.

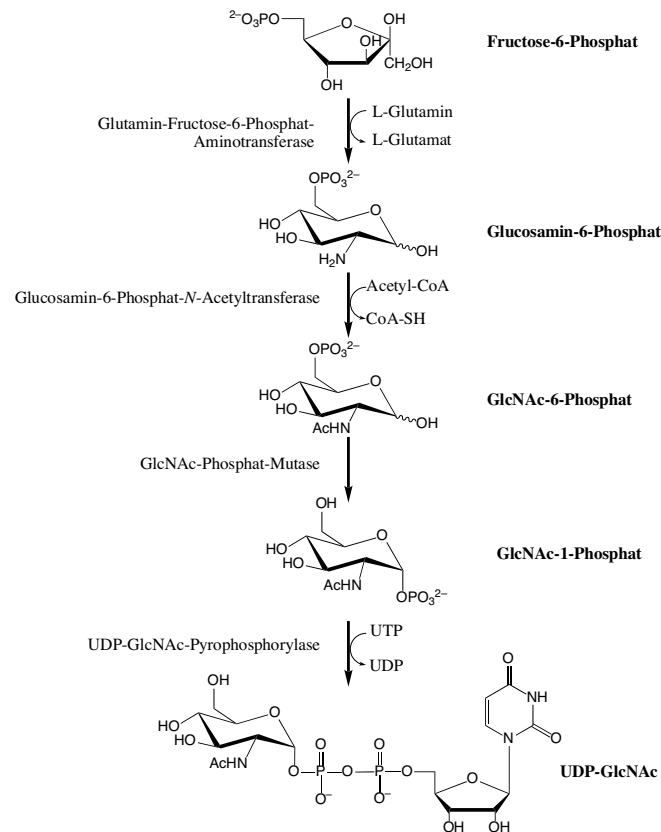


Abbildung 1.3: Aminosuckerstoffwechsel in Säugetierzellen.

Die cytosolischen Enzyme des Aminosuckerstoffwechsels kommen in der Regel in nahezu allen Geweben von Säugetieren vor.

N-Acetylhexosamine werden auch aus dem intrazellulären Abbau von Oligosacchariden gewonnen oder aus der Degradation von Oligosacchariden, die über die Nahrung aufgenommen wurden. Entsprechende Kinasen führen diese Substanzen in den Aminosuckerstoffwechsel zurück. GlcNAc wird durch die GlcNAc-Kinase in 6-Position phosphoryliert (Datta, 1971), *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) durch die ManNAc-Kinase (Gosh und Roseman, 1961). Eine GalNAc-Kinase katalysiert die Bildung von GalNAc-1-phosphat (Pastuszak *et al.*, 1996), das von der UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase weiter zu UDP-GalNAc umgesetzt wird. Anschließend katalysiert die UDP-GalNAc-4-Epimerase die reversible Umwandlung zu UDP-GlcNAc. Die kinetischen Daten des Enzyms sprechen dafür, daß ein Konzentrationsverhältnis von UDP-GlcNAc zu UDP-GalNAc von etwa 2:1 eingestellt wird (Piller *et al.*, 1983). Vermutlich ist dieses Verhältnis unabhängig davon, ob die Nukleotidzucker aus der *de novo*-Synthese von UDP-GlcNAc oder aus dem Recycling von GalNAc stammen und stellt so sicher, daß immer ausreichende Mengen beider Substrate zur Verfügung stehen. Die UDP-GalNAc-4-Epimerase katalysiert die Epimerisierung von UDP-GalNAc mit gleicher Geschwindigkeit wie die Epimerisierung von UDP-Gal (Piller *et al.*, 1983). Die enzymatische Reaktion ist NAD^+ -abhängig und kann durch

NADH inhibiert werden (De Luca *et al.*, 1978). Als weiterer kompetitiver Inhibitor wurde UDP gefunden (Piller *et al.*, 1983).

1.3.2 Biosynthese von CMP-Neu5Ac

CMP-Neu5Ac ist das Vorläufermolekül für die Biosynthese aller Sialinsäuren. Es wird in fünf enzymatischen Schritten aus UDP-GlcNAc gebildet (Abb. 1.4). Die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese, die irreversible enzymatische Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu ManNAc und die anschließende Phosphorylierung in 6-Position werden von dem bifunktionellen Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (EC 5.1.3.14/2.7.1.60) katalysiert (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997). Das entstandene ManNAc-6-Phosphat kondensiert anschließend in einer Aldolreaktion mit Phosphoenolpyruvat zu Neu5Ac-9-Phosphat. Diese Reaktion wird durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase (E.C. 4.1.3.20) katalysiert. Bevor der aktivierte Nukleotidzucker der Sialinsäure, CMP-Neu5Ac, gebildet werden kann, muß die Phosphatgruppe von Neu5Ac-9-Phosphat durch eine Phosphatase abgespalten werden. Obwohl eine solche Enzymaktivität in Rattenleber (Warren und Felsenfeld, 1961) und in humanen Erythrozyten (Jourdain *et al.*, 1964) nachgewiesen werden konnte, ist nicht völlig klar, ob es sich um eine spezifische Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.29) handelt, oder ob die Reaktion durch ein unspezifisches Enzym ausgeführt wird.

Die CMP-Neu5Ac-Synthetase katalysiert den letzten Schritt der Sialinsäurebiosynthese, die Aktivierung der Neu5Ac durch CMP. Die CMP-Neu5Ac-Synthetase (E.C. 2.7.7.43) kondensiert CTP und Neu5Ac unter Abspaltung von Pyrophosphat, wobei CMP-Neu5Ac gebildet wird. Obwohl Sialinsäuren in Glycokonjugaten immer α -verknüpft sind (Kolter und Sandhoff, 1997), besitzt die Bindung in CMP-Neu5Ac β -Konformation (Haverkamp *et al.*, 1979). Dadurch wird CMP-Neu5Ac möglicherweise vor dem Abbau durch α -spezifische Sialidasen geschützt. Im Gegensatz zu den anderen Enzymen der *de novo*-Biosynthese von CMP-Neu5Ac, die alle im Cytosol zu finden sind, ist die CMP-Neu5Ac-Synthetase im Zellkern lokalisiert (Kean, 1969; Kean, 1970). Obwohl die Kernlokalisation der CMP-Neu5Ac-Synthetase lange bekannt ist, wird über ihre Funktion bis heute spekuliert. In jüngster Zeit mehren sich jedoch die Befunde, daß das Produkt dieser Enzymreaktion, CMP-Neu5Ac, mit der Regulation der Genexpression in Zusammenhang steht (Büttner *et al.*, 2002).

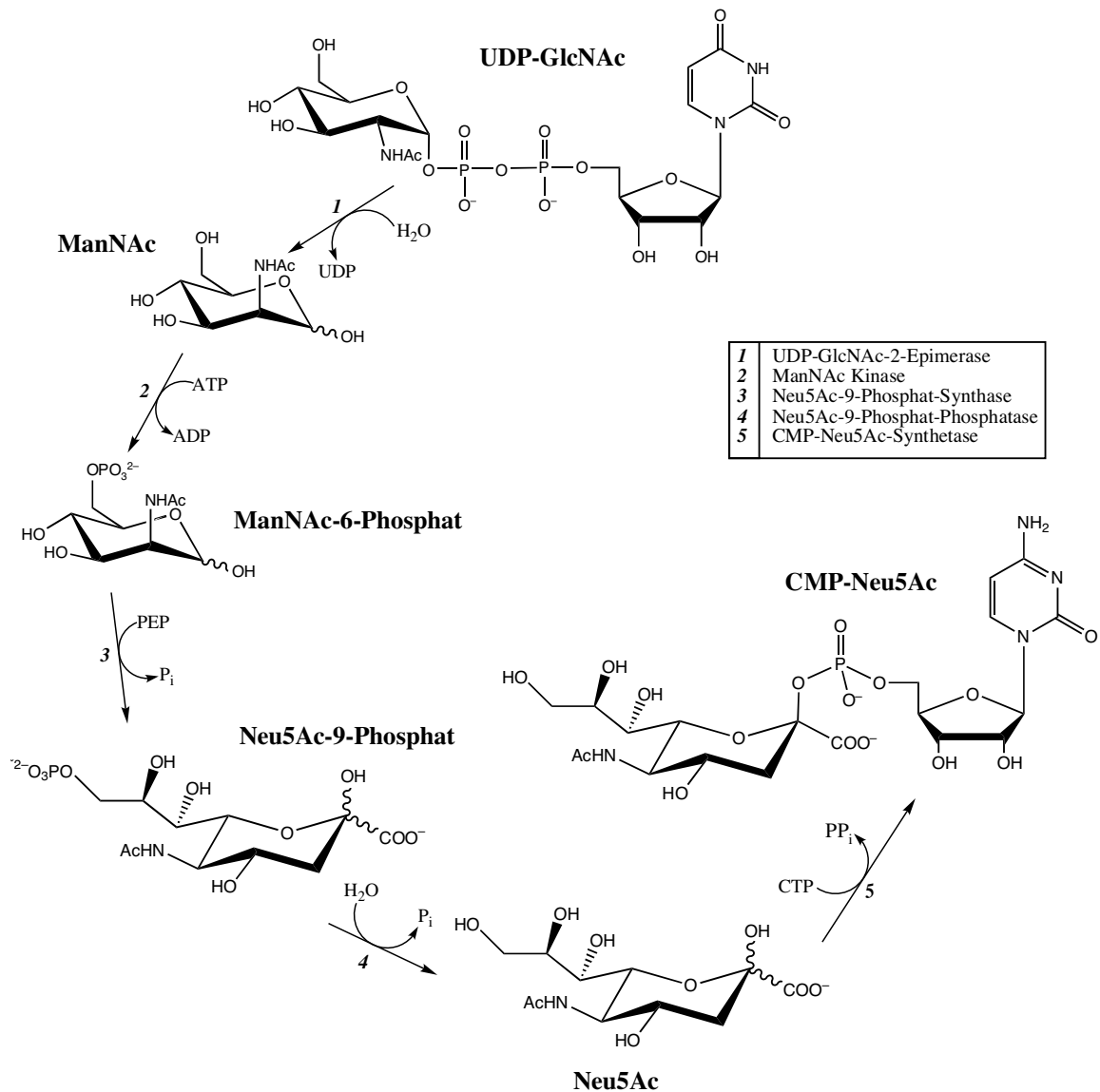


Abbildung 1.4: Sialinsäurebiosynthese in Säugetierzellen.

Neben der Biosynthese von Neu5Ac gibt es auch einen katabolen Stoffwechselweg für Neu5Ac. Als Quelle von freier Neu5Ac kommt zum einen CMP-Neu5Ac in Frage. Die Existenz einer spezifischen CMP-Neu5Ac-Hydrolase ist aber bis heute nicht bewiesen (Kean, 1991). Dafür gelangt aus dem Abbau von Oligosacchariden gewonnene Neu5Ac durch den lysosomalen Anionentransporter ins Cytosol (Mancini *et al.*, 1989). Dort wird sie von der Neu5Ac-Aldolase (E.C. 4.1.3.3) in ManNAc und Pyruvat gespalten, weshalb dieses Enzym auch Neu5Ac-Lyase genannt wird. Das entstandene ManNAc wird durch die GlcNAc-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8) zu GlcNAc umgesetzt. Die von der GlcNAc-2-Epimerase katalysierte Reaktion stellt ein Gleichgewicht zwischen ManNAc und GlcNAc ein. Dieses Gleichgewicht liegt jedoch stark auf der Seite des GlcNAc und unterstreicht die Rolle der GlcNAc-2-Epimerase im katabolen Stoffwechsel der Neu5Ac (Luchansky *et al.*, 2003). Das von der GlcNAc-2-Epimerase gebildete GlcNAc kann

anschließend in den Aminozuckerstoffwechsel eingeschleust werden. Diese Aufgabe übernimmt die GlcNAc-Kinase (EC 2.7.1.59), die GlcNAc am C-6 phosphoryliert. GlcNAc-6-Phosphat kann dann wieder zur Synthese von UDP-GlcNAc genutzt werden oder weiter abgebaut werden. Die GlcNAc-Kinase ist in der Lage, neben GlcNAc auch ManNAc zu phosphorylieren (Allen und Walker, 1980). Fehlt bestimmten Zellen die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, so übernimmt die GlcNAc-Kinase die Phosphorylierung von exogenem ManNAc (Hinderlich *et al.*, 2001).

1.3.3 Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten

Die Aktivierung der Neu5Ac durch CMP erfolgt im Zellkern. Über einen noch nicht bekannten Weg wird CMP-Neu5Ac in das Cytosol freigesetzt. Durch einen Antiport von CMP und CMP-Neu5Ac gelangt der Nukleotidzucker in den Golgi-Apparat. Dieser spezifische Transporter konnte von Eckardt *et al.* (1996) kloniert und molekular charakterisiert werden. Im *trans*-Golgi-Netzwerk wird Neu5Ac durch zahlreiche spezifische Sialyltransferasen unter Abspaltung von CMP auf Oligosaccharidketten von N-Glycanen, O-Glycanen oder auch Gangliosiden übertragen (Harduin-Lepers *et al.*, 1995). Bisher wurden 16 Sialyltransferasen kloniert, die alle eine eigene Akzeptorspezifität aufweisen und eine der folgenden Verknüpfungen bilden: Neu5Ac α 2,6Gal, Neu5Ac α 2,3Gal, Neu5Ac α 2,6GalNAc und Neu5Ac α 2,8Neu5Ac. Die verschiedenen Modifikationen, die zur Bildung der zahlreichen Sialinsäuren führen, werden erst nach der Übertragung der Neu5Ac auf die Oligosaccharidstrukturen durch spezifische Transferasen eingeführt (Schauer, 2000). Die fertig prozessierten Proteine und Lipide werden anschließend von speziellen Transfervesikeln zu ihren Bestimmungsorten gebracht.

1.4 Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese werden von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (EC 5.1.3.14/2.7.1.60) katalysiert. Daß diese Aufgabe von einem bifunktionellen Enzym übernommen wird, ist erst kürzlich gezeigt worden (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997). Zuvor wurden die Enzymaktivitäten unabhängig voneinander beschrieben. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde von Cardini und Leloir (1957) entdeckt, die von ihr katalysierte Reaktion von Comb und Roseman (1958) erstmals korrekt beschrieben. Die ManNAc-Kinase wurde 1961 unabhängig von Gosh und Roseman (1961) bzw. Warren und Felsenfeld (1961) nachgewiesen. Später konnte gezeigt werden, daß sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch die Gewebeverteilung der beiden Enzyme identisch ist (Van Rinsum *et al.*,

1983). Stäsche *et al.* (1997) und Hinderlich *et al.* (1997) konnten schließlich zeigen, daß beide Enzymaktivitäten auf einem Polypeptid als bifunktionelles Enzym exprimiert werden.

Trotz ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel der Sialinsäure konnten UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Spivak und Roseman, 1966; Sommar und Ellis, 1972a; Kikuchi und Tsuiki, 1973) bzw. ManNAc-Kinase (Kundig *et al.*, 1966) lange Zeit aus verschiedenen Quellen nur partiell angereichert werden und verhielten sich instabil. Erst 1997 gelang es, eine stabile und homogene Fraktion aus Rattenleber zu gewinnen (Hinderlich *et al.*, 1997). Das gereinigte Enzym aus Rattenleber bildet sowohl ein Hexamer als auch ein Dimer aus 75 kDa-Untereinheiten (Hinderlich *et al.*, 1997). Das Hexamer besitzt beide Enzymaktivitäten, das Dimer lediglich ManNAc-Kinase-Aktivität. Dies deutet darauf hin, daß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität durch verschiedene oligomere Strukturen reguliert werden kann. Kornfeld *et al.* (1964) zeigten, daß dieses Enzym außerdem einer strengen Feedback-Inhibierung durch CMP-Neu5Ac unterliegt. Zusätzlich wird das Enzym durch die Proteinkinase C phosphoryliert, was zu einem Anstieg der Epimeraseaktivität führt (Horstkorte *et al.*, 2000). Die komplexe Regulation durch verschiedene Mechanismen, wie es für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase gezeigt wurde, ist typisch für das Schlüsselenzym eines Stoffwechselweges. Die Aktivität der ManNAc-Kinase wird durch sämtliche Regulationsmechanismen nicht nennenswert beeinflußt, was ein zusätzlicher Hinweis auf die zentrale regulatorische Rolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist.

Die Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist ebenfalls reguliert. So weist Hepatomgewebe im Vergleich zu normalem Lebergewebe eine um mehr als 90% verringerte Expressionsrate auf (Reutter *et al.*, 1970; Kikuchi *et al.*, 1971; Harms *et al.*, 1973). Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Synthese von Serumglycoproteinen im Hepatomgewebe zurückzuführen. Auch während der Entwicklung erfolgt eine Regulation der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Expression. Während fötale Leber von Ratte (Kikuchi *et al.*, 1971) und Meerschweinchen (Gal *et al.*, 1997) eine geringe Expression des Proteins aufweist, steigt diese kontinuierlich während der frühen Entwicklungsphase, erreicht etwa zwei Wochen nach der Geburt einen Höhepunkt und pendelt sich dann auf ein etwas niedrigeres Niveau ein.

Die zentrale Rolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase für die Regulation der Sialylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden der Plasmamembran konnte durch Arbeiten an hämatopoietischen Zelllinien gezeigt werden, die keine Expression des Enzyms mehr aufwiesen (Keppler *et al.*, 1999). Solche Zellen sind nicht mehr in der Lage, eigenständig Sialinsäuren zu bilden und weisen zahlreiche funktionelle Defekte auf, so etwa die fehlende homophile Interaktion des Siglec2, die Interaktion des

P-Selektins mit seinen Liganden (Keppeler *et al.*, 1999) oder auch die Reduktion der Zell-Matrix-Interaktion (Suzuki *et al.*, 2002). Wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase durch gezielte Mutagenese in der Maus ausgeschaltet, sterben die Embryonen spätestens am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Sialinsäuren für die Embryonalentwicklung essentiell sind.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde bisher aus Ratte (Stäsche *et al.*, 1997), Maus (Horstkorte *et al.*, 1999) und Mensch (Lucka *et al.*, 1999) kloniert. Die Homologie der Aminosäuresequenz ist sehr hoch, zwischen Ratte und Maus sind 4, zwischen Ratte und Mensch 10 und zwischen Maus und Mensch 12 von 722 Aminosäuren unterschiedlich. Sequenzvergleiche mit Zuckerkinasen bzw. bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen legen zwei funktionelle Domänen nahe, eine N-terminale Epimerase- und eine C-terminale Kinasedomäne. Punktmutationen konservierter Aminosäuren führen zu einem selektiven Verlust der Enzymaktivität der jeweils betroffenen Domäne, ohne die Aktivität der anderen Domäne zu beeinflussen (Effertz *et al.*, 1999). Welche Funktion der Zusammenschluß von UDP-GlcNAc-2-Epimerase und ManNAc-Kinase zu einem bifunktionellen Enzym hat, ist bis heute nicht bekannt.

Der Reaktionsmechanismus der ManNAc-Kinase wurde noch nicht näher untersucht, dürfte aber dem gängigen Mechanismus der Zuckerkinasen sehr ähnlich sein. Die Übertragung des γ -Phosphats vom ATP auf die Hydroxylgruppe am C-6 des Zuckers erfolgt über einen trigonal-bipyramidalen Zwischenzustand und bewirkt eine Inversion der Konfiguration am Phosphat (Lowe und Potter, 1981; Pollard-Knight *et al.*, 1982). Der Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist relativ gut untersucht (Abb. 1.5). Im Unterschied zu anderen Epimerasen, etwa der UDP-GalNAc-4-Epimerase, benötigt die UDP-GlcNAc-2-Epimerase für die katalytische Reaktion kein Coenzym, wie z.B. NAD^+ . Die Reaktion erfolgt höchstwahrscheinlich in mehreren Schritten (Tanner, 2002). Zunächst wird durch eine E1-ähnliche Reaktion aus UDP-GlcNAc das intermediäre Zwischenprodukt 2-Acetamidoglucal gebildet. Dies erfolgt in einer *anti*-Elimination von UDP und des nicht-aziden Protons am C-2. Die Abstraktion des Protons am C-2 wird durch eine Base stark begünstigt. Homologien zur UDP-GlcNAc-2-Epimerase aus *E. coli*, von der die dreidimensionale Struktur bekannt ist, favorisieren Histidin 220 für diese Rolle (Campbell *et al.*, 2000). Das Intermediat 2-Acetamidoglucal wird anschließend im Enzym durch säurekatalysierte *syn*-Addition von Wasser zu ManNAc umgesetzt. Das Zwischenprodukt dieser Epimerisierungsreaktion, das 2-Acetamidoglucal, wurde bereits 1972 von Sommar und Ellis (1972b) postuliert. Ein deutliches Indiz für den beschriebenen Mechanismus war die Entdeckung dieses Metaboliten im Urin von Sialurie-Patienten (Kamerling *et al.*, 1979).

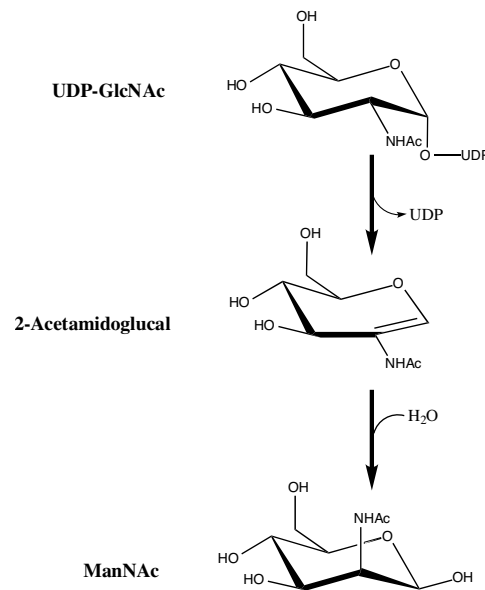


Abbildung 1.5: Postulierte enzymatische Reaktion der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Säugetieren. Zunächst wird in einer Eliminierungsreaktion durch Säureaktivierung UDP abgespalten und das Proton am C-2 von einer Base abstrahiert. Am entstandenen 2-Acetamidoglucal wird anschließend von der α -Seite Wasser angelagert, wodurch ManNAc entsteht.

Sialurie ist eine sehr seltene Stoffwechselkrankheit, die sich durch große Mengen (mehrere Gramm pro Tag) 2-Acetamidoglucal und freier Neu5Ac im Urin auszeichnet. Die Patienten leiden an Entwicklungsstörungen und Lebervergrößerung (Ferreira *et al.*, 1999; Enns *et al.*, 2001). Die molekulare Ursache der Sialurie ist ein Defekt der Feedback-Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch CMP-Neu5Ac, mit der Folge einer unkontrollierten Produktion von Neu5Ac (Weiss *et al.*, 1989; Seppala *et al.*, 1991). Die bisher untersuchten Patienten weisen Punktmutationen von Arginin-263 bzw. Arginin-266 in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf (Seppala *et al.*, 1999). Die Mutationen treten heterozygot auf, der Gendefekt ist daher dominant (Leroy *et al.*, 2001). Neben den Mutationen in den Sialurie-Patienten fanden Yarema *et al.* (2001) Punktmutationen weiterer 7 Aminosäuren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in Subklonen von Jurkat-Zellen, die ebenfalls den Sialurie-Phänotyp aufwiesen. Diese Mutationen legen die Lokalisation der CMP-Neu5Ac-Bindungsstelle zwischen den Aminosäuren 249 und 275 nahe.

Kürzlich wurde eine zweite Krankheit entdeckt, die auf Punktmutationen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zurückzuführen ist (Eisenberg *et al.*, 2001). Es handelt sich dabei um die „Hereditary Inclusion-Body-Myopathie“ (HIBM). Sie zeichnet sich durch eine im Erwachsenenalter beginnende, langsam fortschreitende Schwächung von distalen und proximalen Muskeln aus. Die Mutationen verteilen sich über das gesamte Protein, sowohl die Epimerase- wie auch die Kinasedomäne sind betroffen. Zellen von HIBM-Patienten weisen keinen offensichtlichen Sialylierungs- bzw. Glycosylierungsdefekt auf, so daß bis heute völlig unklar ist, durch welchen

Mechanismus die Mutationen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase HIBM verursachen können.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Sialinsäuren sind essentiell für zahlreiche lebenswichtige biologische Prozesse in Zellen, insbesondere in Säugetierzellen. Die vielfältigen Funktionen der Sialinsäuren spiegeln sich in den zahlreichen Modifikationen der *N*-Acetylneuraminsäure, dem Vorläufermolekül aller Sialinsäuren, wider. *N*-Acetylneuraminsäure wird den Zellen durch eine fünfstufige enzymatische Synthese aus UDP-GlcNAc zur Verfügung gestellt. Die ersten beiden Schritte dieser Synthese werden von dem bifunktionellen Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase katalysiert. Die Aktivität dieses Enzyms unterliegt einer komplexen Regulation. Aus diesem Grund, und weil das Enzym für die Abzweigung des UDP-GlcNAc aus dem Aminosäurestoffwechsel in die Sialinsäurebiosynthese sorgt, wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auch als Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese bezeichnet.

Um ein besseres Verständnis über die Funktion von Sialinsäuren zu erhalten, sind gezielte Eingriffe in die Biosynthese der Sialinsäuren bzw. von Glykokonjugaten wünschenswert. Durch chemische Synthese zahlreicher Inhibitoren für Sialyltransferasen (Klohs *et al.*, 1979; Schaub *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998) ist es möglich geworden, die Regulation der Sialylierung durch Sialyltransferasen genauer zu untersuchen (Eckhardt *et al.*, 1996). Interessante Aufschlüsse über biologische Effekte und die Bedeutung der Seitenketten von Sialinsäuren konnten durch Behandlung von Zellen mit chemisch modifizierten Sialinsäuren bzw. deren modifizierten metabolischen Vorläufern gewonnen werden (Keppler *et al.*, 2001; Oetke *et al.*, 2002). Für weitere Untersuchungen zur Funktion und Biosynthese von Sialinsäuren wäre es sehr hilfreich, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, durch Synthese verschiedener Inhibitoren gezielt zu inaktivieren. Auch im Hinblick einer quantitativ erhöhten Sialylierung vieler Tumorzellen könnten Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase eine wichtige Basis für pharmazeutische Krebstherapeutika darstellen.

Für derartige Studien muß die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in größeren Mengen und möglichst in reiner Form vorliegen. Aus einer Rattenleber können nur etwa 100 µg Enzym isoliert werden (Hinderlich *et al.*, 1997). Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein geeignetes Expressionssystem für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase etabliert werden. Anschließend sollte ein Reinigungsschema für das überexprimierte Enzym erarbeitet werden, um Strukturuntersuchungen durchführen zu können und um die potentiellen Inhibitoren auf

ihre inhibitorische Wirkung zu testen. Außerdem sollte versucht werden, die beiden Enzymaktivitäten des bifunktionellen Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase getrennt zu exprimieren, um so die Enzymaktivitäten separat untersuchen zu können.

